

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Karolina Noor

C-titiin vastsündinud hiire neuraalsetes tüvi- ja eellasrakkudes

Magistritöö

Juhendaja professor Aavo-Valdur Mikelsaar

Kaasjuhendaja dotsent Sulev Ingerpuu

TARTU 2015

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Titiin.....	6
1.2 Neuronite ja gliarakkude markervalgud.....	11
1.2.1 β -III-tubuliin	11
1.2.2 GFAP	11
1.2.3 SOX2.....	12
1.3 Neuraalne kude.....	13
1.3.1 Neuraalsed tüvirakud	13
2. EKSPERIMENTAALOSA	15
2.1 Töö eesmärgid	15
2.2 Materjal ja metoodika.....	15
2.2.1 Uurimisobjekt.....	15
2.2.2 Hiire neurosfäärade kasvatamine ja diferentseeruma suunamine	15
2.2.3 Rakkude fikseerimine ja permeabiliseerimine	16
2.2.4 Rakkude immunotsütokeemiline värvimine.....	16
2.2.5 Rakkude pildistamine	16
2.2.6 Koelõikude tegemine krüostaat-mikrotoomiga ja immunohistokeemiline värvimine	17
2.2.7 Uurimistöös kasutatud antikehad.....	17
2.2.8 C-titiini molekulmassi määramine SDS-PAGE elektroforeesi ja Western blot	
meetodil.....	18
2.3 Tulemused.....	19
2.3.1 Neurosfäärade kasvatamine <i>in vitro</i> ja titiini avaldumine	19
2.3.3 Titiini ja neuraalsete markerite (β -III-tubuliin ja GFAP) avaldumine	
diferentseerunud rakkudes	22
2.3.4 Titiini ja F-aktiini ekspressioon diferentseerimisele suunatud rakkudes	29
2.3.5 Titiini ekspresseerumine hiire aju külmlõikudel.....	29
2.3.6 Titiini molekulmassi määramine Western blot meetodil.....	31
2.4 Arutelu.....	31
KOKKUVÕTE.....	37
SUMMARY	38

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	40
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	46
TÄNUSÕNAD	47
LISAD	48
Lisa 1. Kasvukoonuse struktuur	48
LIHTLITSENTS.....	49

KASUTATUD LÜHENDID

BLBP – aju lipiidi siduv valk (ingl.k. *brain lipid-binding protein*)

DAB – 3,3'-diaminobensidiin tetra hüdrokloriid (ingl.k. *3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride*)

DAPI – 4', 6-diamino-2-fenüülindool (ingl.k. *4', 6-diamino-2phenylindole*)

EGF – epidermaalne kasvufaktor (ingl.k. *epidermal growth factor*)

F-aktiin – fibrillaarne aktiin (ingl.k. *fibrillar actin*)

FCS – veise loote seerum (ingl.k. *fetal calf serum*)

FGF2 – fibroblasti kasvufaktor 2 (ingl.k. *fibroblast growth factor 2*)

G-aktiin – globulaarne aktiin (ingl.k. *globular actin*)

GAM – hiirevastane kitse antikeha (ingl.k. *goat anti-mouse*)

GAR – küülikuvastane kitse antikeha (ingl.k. *goat anti-rabbit*)

GAM-HRP – hiirevastane kitse sekundaarne antikeha, seotud määrõika peroksüdaasiga (ingl.k. *goat anti mouse horseradish peroxidase secondary antibody conjugate*)

GAR-HRP – küülikuvastane kitse sekundaarne antikeha, seotud määrõika peroksüdaasiga (ingl.k. *goat anti mouse horseradish peroxidase secondary antibody conjugate*)

GBM – multiformne glioblastoom (lad.k. *glioblastoma multiforme*)

GFAP – gliia fibrillaarne happeline valk (ingl.k. *glial fibrillary acid protein*)

KNS – kesknärvisüsteem (ingl.k. *central nervous system*)

LIF – leukeemiat inhibeeriv faktor (ingl.k. *leukemia inhibitory factor*)

MAb – monoklonaalne antikeha (ingl.k. *monoclonal antibody*)

MARP - lihase anküriini kordusvalk (ingl.k. *muscle ankyrin repeat protein*)

MBP – müeliini põhivalk (ingl.k. *myelin basic protein*)

NSA – neurosfäärade meetod (ingl.k. *neurosphere assay*)

NSC – neuraalne tüvirakk (ingl.k. *neural stem cell*)

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (ingl.k. *phosphate buffered saline*)

PDGF – trombotsüütide poolt toodetud kasvufaktor (ingl.k. *platelet-derived growth factor*)

PFA – paraformaldehüüd (ingl.k. *paraformaldehyde*)

PMSF – fenüülmetüülsulfonüül fluoriid (ingl.k. *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

RA – retinoid hape (ingl.k. *retinoic acid*)

SDS – naatrium dodetsüül sulfaat (ingl.k. *sodium dodecyl sulfate*)

SISSEJUHATUS

Juba 1954. aastal oletas Reiji Natori, et skeletilihases peab olema elastne struktuur, mis selgitaks lihaskiudude tagasitõmbumise algasendisse pärast pingutust. Siiski, alles aastal 1977. aastal isoleeriti lihaskiududest elastsete omadustega valk, mida autorid nimetasid **konnektiiniks**. Kaks aastat hiljem näidati elektroforeetiliselt, et tegemist on väga suure valguga, millele anti siis tema hiiglaslike mõõtmete tõttu nimeks **titiin**.

Järgnevatel aastatel on intensiivselt uuritud titiini struktuuri ja funktsiooni südame -ja skeletilihastes ning on leitud, et titiini geeni mutatsioonid põhjustavad paljusid lihashaigusi.

Ehkki titiini on leitud ja uuritud eelkõige mitmesugustes lihasrakkudes, on järk-järgult kogunenud andmeid tema ekspressioonist ka teist tüüpi rakkudes ja sealt leitud titiini nimetatakse rakuliseks titiiniks, lühidalt c-titiiniks (ingl.k. *cellular titin*).

C-titiini on leitud fibroblasti tüüpi rakkudes seotuna stressikiududega. Teda on seostatud lisaks ka kromosoomide kondensatsiooni ja segregatsiooniga mitoosis ning osalemisega tsentrosoomide struktuuris.

C-titiini esinemise ja paiknemise kohta neuraalses koes on vähe andmeid, ehkki immunohistokeemiliselt on leitud nõrka titiini ekspressiooni suurajukoores, väikeaju molekulaarkihis, purkinje rakkudes, neuronites, hippokampuses ning külgvatsakestes (lateraalstes ventriiklites).

Samuti on meie uuringud (A-V Mikelsaar, K.Noor, avaldamata andmed) näidanud, et C-titiin ekspresseerub inimese mitmetes ajukasvajate rakuliinides.

Käesoleva magistritöö **põhieesmärgiks** oli selgitada, kas C-titiin on detekteeritav ajukoest eraldatud neurosfäärides ja neist diferentseerunud rakkudes. Uurimismaterjalina kasutati vastsündinud hiire aju ja titiini ekspressiooni hindamiseks immuunokeemilisi meetodeid.

Magistritöö teostati Tartu Ülikooli arstiteaduskonnas bio- ja siirdemeditiini instituudi biomeditsiini osakonna inimese bioloogia ja geneetika õppetoolis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Titiin

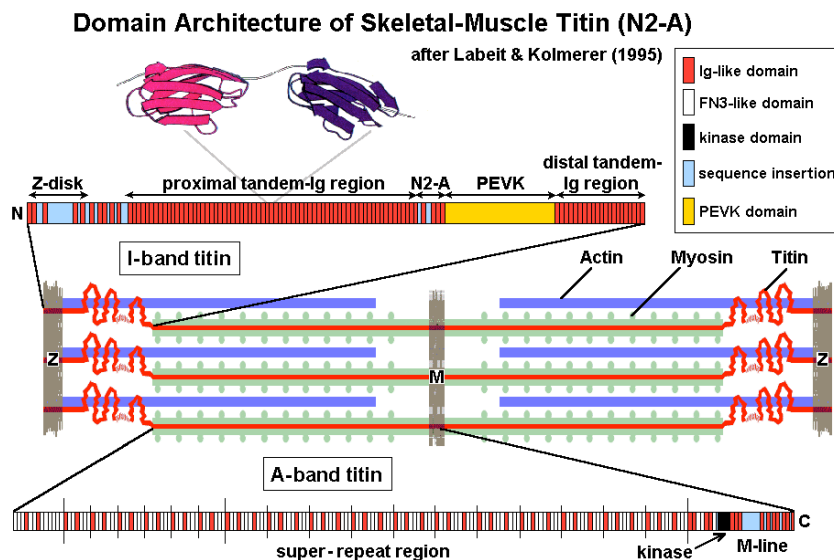
Aastal 1977 õnnestus lihaskiust eraldada elastne valk, mis nimetati konnektiiniks (Maruyasa *et al.*, 1977). 1979. aastal leiti kana rinnalihasest samuti üks suure molekulmassiga valk (Wang *et al.*, 1979). Kuigi täpset molekulkaalu määrata ei õnnestunud, oldi kindlad, et tegemist on ühe suurima avastatud valguga, mistõttu talle anti nimeks titiin (kr. keelest, Titan kui hiiglane; miski, mis või kes on väga suur) (Wikipedia, 2015). Järgnevatest uuringutest selgus, et konnektiin ja titiin on üks ja sama valk. Veel praegugi kasutatakse mõlemat terminit, ehkki sagedasemat kasutamist on leidnud nimetus titiin.

Titiini kodeerib geen *TTN*, mis paikneb nii inimese kui ka hiire 2. kromosoomi pikas õlas lookuses 2q31.1 (Wikipedia, 2015). Inimese titiini suurim (kanooniline) isovorm koosneb 34 350 aminohappest molekulmassiga 3 816 188.13 Da (ExPASy Proteomics Server, 2015). Titiini homoloog hiires on veidikene suurem, koosnedes 35 213 aminohappest ning selle molekulmass on 3 906 487.6 Da (ExPASy Proteomics Server, 2015).

Titiini funktsioon lihasrakkudes

Sarkomeer on ülimalt täpselt organiseeritud filamentide süsteem, mis sisaldab aktiini, müosiini ja titiini ning on skeleti- ja südamelihases peamiseks kontraktsiooni üksuseks. Titiini suurus ulatub vahemikku 2000-4000 kDa ja ta on lihase puhkeasendis ligi 1 µm pikk (Labeit and Kolmerer, 1995).

Titiini molekuli spetsiifilised omadused määravad tema rolli vöötlihases. Arenevas lihases seob titiin uued müosiini filamendid kokku sarkomeerideks ja reguleerib sarkomeeri morfogeneesi läbi tema kinaasse domeeni aktiivsuse. Titiini N-terminaalne piirkond seostub sarkomeeri Z-kettaga. Titiini C-terminaalne piirkond seostub aga sarkomeeri keskel oleva M-piirkonna ja müosiin II bipolaarse paksu filamendi ühe poolusega (Joonis 1).

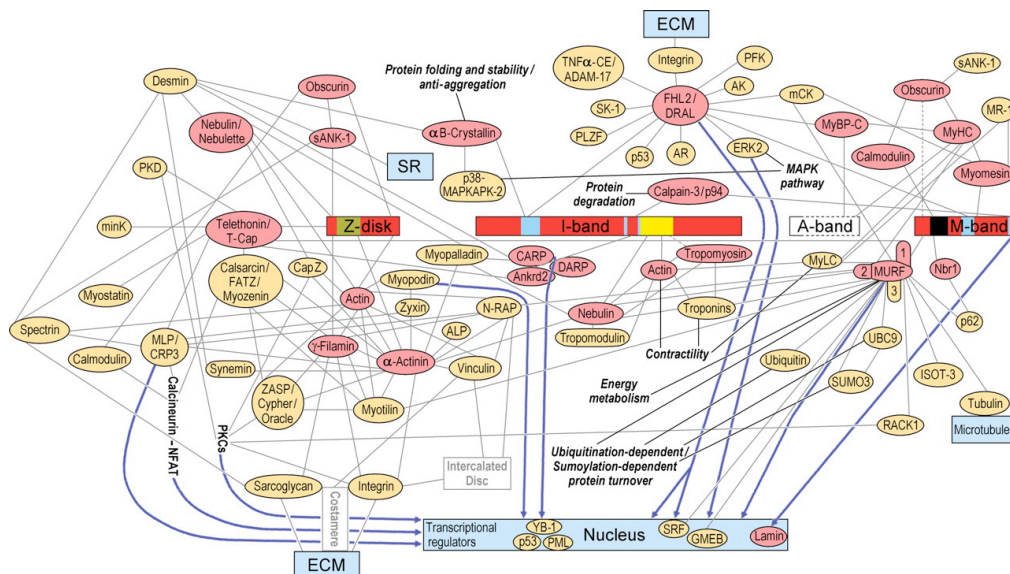


Joonis 1. Titiini paiknemine skeletilihase sarkomeeris (Labeit ja Kolmerer, 1995).

Titiini N-terminaalne ots on seotud Z-kettaga ja on ankurdunud teletoniinile ning alfa-aktiniinile. I-vöödis olev titiin sisaldab immunoglobuliini sarnaste domeenide ja elastse PEVK piirkonna tandeemseid järjestusi. A-vöödi titiin on tugevalt seostunud müosiini bipolaarse filamendi ühe poolusega. Titiini C-terminus paikneb M-piirkonnas ning sisaldab kinaasi domeene (Labeit and Kolmerer, 1995; modif. Cavnar, 2008).

Titiini seostumine teiste valkudega

Titiin seostub mitmete valkudega. Otsesed ning kaudsed seosed tõestavad, et titiin funktsioneerib kui sarkomeeride siduja (Joonis 2).



Joonis 2. Titiini interaktiooni kaart. Kokkuvõtte seostest titiini (Z/I/A/M-vöödi) ja tema otseste (punased ovaalid) ning kaudsete (kollased ovaalid) ligandide vahel (Linke W.A., 2007).

Sinised nooled näitavad tsütoplasma- ja tuumavalkude otseseid seoseid. SR, sarkoplasmaatiline retiikulum; ECM, ekstratsellulaarne maatriks; AK, adenülaatkinaas; ALP, aktiniin seostunud LIM valk; Ankrd2, anküriin kordusdomeeni valk 2; AR, androgeeni retseptor; CARP, kardiaalne anküriin-kordusvalk; DARP, diabeedisarnane anküriin

kordusvalk; ERK2, ekstratsellulaarne signaalreguleeritud kinaas 2; FATz, filamiin-/aktiniin-/teletoniin seonduv Z-liini valk; FHL2 (DRAL), neli ja pool LIM-valgu domeeni valk; GMEB, glükokortikoid modulaatorelemente seondav valk; ISOT-3, isopeptidaas-T-3; MAPK, mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas; mCK, lihas-kreatiini kinaas; minK, kaaliumkanali subühik; MLP (CRP3), lihas-LIM-valk (tsüsteiinirikas valk 3); MR-1, müofibrillogeneesi regulaator-1; MURF, lihasspetsiifiline RING-sõrm valk; MyHC, müosiini raske ahel; MyLC, müosiini kerge ahel; Nbr1, BRCA1 geeni naabervalk 1; NFAT, aktiveeritud T-rakkude tuumafaktor; N-RAP, nebuliini sarnane ankurvalk; p38-MAPKAPK-2, p38 aktiveeritud ning MAPK, mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas 2; PFK, fosfofruktokinaas; PKCd, proteiinkinaas-C isoformid; PKD, proteiinkinaas-D; PLZF, promüelüütiline leukeemia tsinksõrme valk; PML, promüelüütiline leukeemia valk; RACK-1, aktiveeritud C-kinaas 1 retseptor; sANK-1, väike anküriin-1 isovorm; SK-1, sfingosiinkinaas-1; SRF, seerumvastus faktor; SUMO3, väike ubikvitiinisarnane modifitseerija 3; TNFa-CE (ADAM-17), kasvaja nekroosifaktori alfa konverteerimisensüüm (A-disintegriini ning metalloproteas-17 valk); UBC9, ubikvitiini konjugeeriv ensüüm-9; YB-1, Y-boxi seondav valk 1; ZASP, Z-liini alternatiivselt ühendatud PDZ-motiivi valk.

Titiini ehitus

Titiin koosneb peamiselt kahest lineaarse järjestusega domeenist: tüüp I, fibronektiini sarnane domeen, 132 koopiat (ingl.k. *FN3-like domain*) ja tüüp II e. immunoglobuliini sarnane domeen, 122 koopiat (ingl.k. *Ig-like domain*) (Labeit and Kolmerer, 1995).

Nimetatud lineaarne järjestus jaguneb omakorda veel kaheks regiooniks:

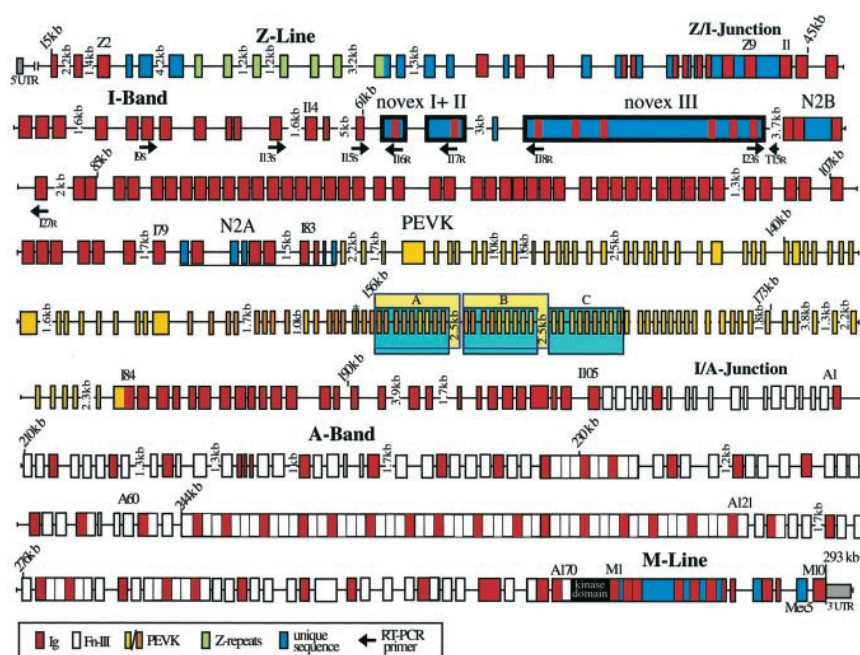
N-terminaalne I-vööt: koosneb peamiselt tüüp II domeenidest ja toimib molekuli elastse osana, külgnedes PEVK regiooniga. PEVK regiooni nimi tuleneb aminohapete proliini (P), glutamaathappe (E), valiini (V) ja lüsiini (K) rohkusest. Tegemist on äärmiselt elastse ja veniva N2A piirkonnas paikneva regiooniga, mis sisaldab 110-225 eksonit, millelt kodeeritakse 26-28-st kõrgelt konserveerunud aminohappe jäägist koosnevaid domeene. PEVK regioon on korrapäratu struktuuriga ja koosneb kahest eraldiseisvast motiivist. Neist esimene on lüsiinirikas PPAK motiiv, mis lõdvestunud sarkomeeris voltub polüproliini tüüp-II heeliksiks, andes sellele piirkonnale üldise positiivse laengu (Ma *et al.*, 2001). Teine motiiv on polü-E-motiiv, mille regioonid koosnevad peamiselt glutamaathapest ja tagavad sellega üldise negatiivse laengu (Greaser, 2001). PEVK regioon hõlmab endas ka palju SH3 seondumissaite (Ma *et al.*, 2006).

I-vööt sisaldab lisaks veel kahte unikaalset piirkonda, milleks on N2B ning N2A. Eranditult südamelihase sarkomeeris ekspresseeruv N2B on unikaalne regioon, kuna suudab lahti hargneda, tagades sellega suure elastsuse (Linke, 2008). Kardialse sarkomeeri lõdvestunud olekus on PEVK ja N2B regioonid voltunud proksimaalselt ning distaalselt Ig domeenidega. Sarkomeeri pikenedes venivad Ig domeenid välja ja edasine pinge tekib juba PEVK ning N2B lahtivoltumisega lineaarseks vormiks (Fukuda *et al.*, 2005). Vastupidiselt N2B

regioonile ekspresseerub N2A regioon kõikides titiini isovormides. Viimaste uuringute kohaselt on N2A sarkomeeris potentsiaalne signalisatsioonikeskus. Regioon sisaldab p94/kalpaiin 3 ja lihase anküriini kordusvalkude (MARF) seondamissaite (Miller *et al.*, 2003). Arvatakse, et N2A-p94/kalpaiini interaktsioon reguleerib MARF ja p94 aktiivsust ning p94 seostumine N2A-le hõlbustab proteolüüsi lihasvigastuste ära hoidmisel (Hayashi *et al.*, 2008).

Ig ja PEVK domeenide hulk ja koosseis ning N2B domeeni olemasolu/puudumine dikteerivad titiini isovormide pikkuse lõtvunud olekus, samuti valgu kogu ülejäänud venivuse ja sarkomeeri passiivse pinge (Greaser, 2001).

C-terminaalne A-vööt: arvatakse, et see piirkond annab valgule kuju ning tal on ka kinaasne aktiivsus. A-vöödile iseloomulikult asuvad seal Ig ja Fn3 domeenide regulaarsed mustrid, mida nimetatakse 'superjärjestusteks', mis on müosiinile seondumiskohtadeks. D-tsoon koosneb kuuest 7-domeenilisest Ig-Fn3 superjärjestusest [IG-(Fn3)2-IG-(Fn3)3] ja C-tsoon koosneb üheteistkümnest 11-domeenilisest Ig-Fn3 superjärjestusest [IG-(Fn3)2-IG-(Fn3)3-IG-(Fn3)3] (Joonis 3) (Labeit *et al.*, 1992; Labeit *et al.*, 1997).



Joonis 3. Titiini geeni ekson-intron struktuur.

363 eksonit kodeerivad 38138 aminohappe jääki. Geeni segmendid vahemikes 60-75 kb ja 144-175 kb sisaldavad mõlemad 50 eksonit. 47 eksonit kodeerivad ligi 28-st aminohappe jäägist koosnevat PEVK järjestust, millest mõned identifitseeriti hiljaaegu inimese loote titiini. Novex-1, -2 ja -3 paiknevad kardiaalse N2B vedru elemendi 5' otsas. Kastikestesse eraldatud PEVK segmendid (A, B, C) vastavad duplitseeritud genoomsetele piirkondadele (Bang, *et al.*, 2001).

Titiini M-piirkond koosneb seriini/treoniini kinaasi domeenidest, kuuludes müosiini kerge ahela kinaaside perekonda. M-piirkond on reguleeritud kaheselt – läbi Ca^{2+} /kalmoduliini seondumise inhibitoorsele regulatoorsele sabale ja samuti tänu aktiivsaiidi türosiini fosforüleerumisele teadmata kinaasi poolt (Mayans *et al.*, 1998). Titiini kinaas on oluline müofibrillogeneesis ja fosforüleerib teletoniini valguga (T-cap) seostunud Z-ketta valke. Arvatakse, et T-cap võiks funktsioneerida kui titiini kinaasi substraat, kuid kindlad tõendid selle kohta puuduvad. Teatakse aga, et lihase arhitektuur sõltub otseselt titiini kinaasi funktsioneerimisest (Gregorio *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2003; Musa *et al.*, 2006; Gotthardt *et al.*, 2003).

Titiini isovormid

Alternatiivse splaissingu tulemusena ekspresseeritakse rakkudes suurel hulgal titiini isovorme (Uniprot, 2015). Isovormide ekspressioon on koespetsiifiline. Skeetilihas on valdavaks isovormiks täispikk N2A-titiin molekulmassiga 4000 MDa ja pikkusega 1 μm . Südamelihases leidub võrdselt kahte titiini isovormi. Üheks neist on N2B titiin molekulmassiga umbes 3 MDa, mis on lühem ja jäigem isovorm ning sisaldab PEVK geenipiirkonda, mis kodeerib 186 aminohapet. Teiseks isovormiks on N2BA isovorm, mis on suurem (3,2-3,7 MDa) ja sisaldab nii N2B kui ka N2A domeeni. Titiini isovormid N2BA ja N2B määravad südamelihase jäikuse ning ekspresseeruvad erinevate liikide puhul erinevas suhetes (Linke, 2008). Titiini isovorme on leitud ka silelihases (Kim and Kellel, III, 2002; Labeit *et al.*, 2006), kus nad on üheks osaks silelihase kontraktsiooni aparaadis (Kim and Keller, III, 2002). Lisaks veel äädikakärbsel rakkude tuumadest ja mittelihasrakkudest (Zastrov *et al.*, 2005; Machado and Andrew, 2000). Arvatakse, et titiin võiks olla seotud tuuma ümbrise terviklikkusega ja kromosoomide struktuuriga (Eilertsen and Keller, III, 1992; Eilertsen *et al.*, 1994; Machado 1998).

C – titiin

Mittelihasrakkudes esinevat titiini kirjeldati kui tsellulaarset titiini (c-titiin) ja ta avastati kana soole epiteeli hattudest ning trombotsüütidest. Leiti, et struktuurilt sarnaneb ta vöötlihase titiinile, mis seondub müosiin-II ja alfa-aktiniiniga (Eilertsen and Keller, III, 1992; Eilertsen *et al.*, 1994). Tuvastati, et titiin asub aktiini ja müosiiniga seotud stresskiududes (Canvar, 2008; Eilertsen *et al.*, 1994; Ven van der *et al.*, 1993; Canvar *et al.*, 2007; Wernej *et al.*, 2001).

Inimese megakarüotsüütide kogu RNA-st on isoleeritud 3 titiini mRNA transkripti: 2 täispikka c-titiini isovormi, mis sisaldavad titiini kinaasi domeeni ja lühem Novex-3

isovorm. C-titiin näitab Z-kordusele (Zr1, Zr2, Zr3 ning Zr7) kinnitunud alfa-aktiniinis eksonite organiseeritust. C-titiinis on esindatud ka PEVK regioon (Canvar, 2008; Bang *et al.*, 2001).

Samuti on täheldatud titiini olemasolu rakkudes ka stresskiududega mitteseotuna. Sellest lähtuvalt on arvatud, et titiin üksi või interakteerudes kas veel tuvastamata partneritega või teadaolevate tsütoskeleti struktuuridega, moodustab superstruktuure, mis mõjutavad rakke veel teadmata viisil (Canvar, 2008). Seda väidet toetab C-titiini leidmine tsentrioolidest ja mitoosikäävis (Mikelsaar *et al.*, 2010). Väidetavalt on titiin kromosomaalne valk (Machado *et al.*, 1998; Machado *et al.*, 2000), kuid proteoomika uuringud sellele kinnitust leidnud ei ole (Takata *et al.*, 2007).

Meie poolt külmlõikudel läbiviidud immunohistokeemilised uuringud on näidanud C-titiini esinemist ka ajukoes (avaldamata andmed).

1.2 Neuronite ja gliiarakkude markervalgud

1.2.1 β -III-tubuliin

β -III-tubuliin on 450-aminohappeline valk, mida kodeerib geen TUBB3. Tubuliin on mikrotuubulite peamiseks koostisosaks. Ta seondub kahe GTP molekuliga - üks beeta ahela muutuva osaga, teine alfa ahela mittemuutuva osaga. TUBB3 mängib ka olulist rolli sobiva aksoni määramisel ja säilitamisel ning neurogeneesil (Tischfield *et al.*, 2010). Ekspressioon piirneb peamiselt tsentraalse ja perifeerse närvisüsteemiga. β -III-tubuliini kasutatakse markerina neuronite tuvastamisel. Lisaks on tubuliini ekspressiooni tugevat suurenemist täheldatud enamikes kasvajasidest kudedes (Katsetos *et al.*, 2003; Leandro-Garcia *et al.*, 2010).

1.2.2 GFAP

Gliia fibrillaarne happeline valk (GFAP, ingl.k. *glial fibrillary acidic protein*) on 432 aminohappeline III klassi intermediaarne filament, mis paikneb tsütoplasmas ning teda ekspresseeritakse astrotsüütides. Tegemist on rakuspetsiifilise markeriga, mis võimaldab uuringutes eristada astrotsüüte teistest gliia rakkudest. GFAP aitab säilitada astrotsüütide mehaanilist tugevust ning ka raku kuju. Samuti on ta kaasatud mitmetesse raku funktsionaalsetesse protsessidesse nagu raku struktuuri säilitamine ja liikumise tagamine, rakkude omavaheline suhtlemine ning talitlus hematoentsefaalses vere-aju barjääris (Usen Life Science Inc, 2015).

GFAP ja ka teised intermediaarsed filamendid jagavad mõningaid keemilisi omadusi ning ühiseid rakusiseseid polüpeptiidide domeene. Samas on tal ka oma unikaalsed ja väga immunogeensed epitoobid. GFAP-i kasutatakse markerina normaalsetele ning neoplastilistele gliia perekonna rakkudele. Tema immunoreaktiivsus täiskasvanu kesknärvisüsteemis (KNS) piirneb protoplasmaatiliste astrotsüütide filamentidega hallolluses ja kiuliste astrotsüütidega valgeolluses ning radiaalse gliiaga väikeajus (McLendon *et al.*, 1994).

Kõrgemate selgroogsete KNS trauma, haigus, geneetiline hälve või keemiline insult muudab astrotsüüdid reaktiivseteks, mis võib astrogliaosiks edasi areneda. Reaktiivne astrogliaos on kahjustatud astrotsüütidele omaseim tunnus. Seda iseloomustab GFAPi intermediaarsete filamentide kiire ja suurenev süntees, mida on võimalik detekteerida valgu hulga määramise ning immunovärvimisega GFAP antikehadega (Eddleston *et al.*, 1993).

Astrotsüütides kasvab GFAPi hulk järk-järgult terve eluea vältel. Kuna GFAPi tase kasvab vanuse suurenedes ja tema toime põhjustab inimese ajukoos hulgaliselt variatsioone, siis immunotsütokeemiliselt on madalatasemelist gliaosi näidata üpris keeruline. Kaks sündroomi, mis näitavad intensiivset gliaosi on põletikuline demüeliniseerumine ja *multiple sclerosis*. Põletikulist demüeliniseerumist iseloomustavad müeliinita aksonitest ja ekstensiivsest reaktiivsest astrogliaosist koosnevad demüeliniseeritud kolded (Hallpike *et al.*, 1983), adrenoleukodüstroofia, pärilik lipiidide metabolismi häire (Schaumburg *et al.*, 1975) ja Alexandri haigus (Eng *et al.*, 1998).

1.2.3 SOX2

Sox2 valk, tuntud ka kui SRY-box 2 (ingl k. *sex determining region Y-box 2*), on oluline transkriptsioonifaktor diferentseerumata embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse säilitamiseks. Sox2 käitub kui transkriptsiooni aktivaator, moodustades teiste valkudega koostöös aktivatsioonikompleksi (Kamachi *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2004; Wegner, 1999). Samas näitavad viimase aja uuringud, et SOX2, ehkki üldiselt tunnustatud kui transkriptsiooni aktivaator, võib ka geenide ekspressiooni pärssida (Liu *et al.*, 2014).

Enne peamiste funktsioonide avastamist jäi tähelepanu alla Sox2 ekspressioon arenevas KNS-s (Collignon *et al.*, 1996), olles aktiivne embrüonaalses närvisüsteemis alates selle varajasest arengust. Lisaks näitab ta osalist aktiivsust veel proliferatsioonil ning mittediferentseerunud eellasrakkudes (Pevny *et al.*, 2010; Wegner *et al.*, 2005). On

näidatud, et SOX2 expressioon on iseloomulik täiskasvanud aju tüvirakkudele, kuid mitte kõik neist ei säilita võimet moodustada kõiki neuraalsete rakkude tüüpe (Brazel *et al.*, 2005). Koostöös mõnede teiste transkriptsioonifaktoritega, suudab Sox2 taastada lõplikult diferentseerunud rakkude pluripotentsuse, reprogrammeerides neid indutseeritud pluripotentseteks tüvirakkudeks (iPS) (Takahashi *et al.*, 2006).

1.3 Neuraalne kude

1.3.1 Neuraalsed tüvirakud

Neuraalsete tüvirakkude teket närvisüsteemi varajase arengu käigus mööda neuraaltoru ektodermi on tõestatud uuringutega nii näriliste kui ka teiste liikide peal (Hitoshi *et al.*, 2002). Selles faasis läbib neuraalne ektoderm peamiselt sümmeetrilised jagunemised, säilitades tüvirakulisused omadused ja viies populatsiooni edasisele arenemisele. Edasises, neurogeenses faasis jagunevad tüvirakud asümmeetriliselt ja toimub uute tüvirakkude tootmine koos proliferuivate, peamiselt neuraalset päritolu eellastega (Qian *et al.*, 1998, 2000; Temple, 2001). Peale neurogeenset faasi arenevad tüvirakud valdavalt gliia järelkasvuks, mille tõttu väheneb nende hulk progressiivselt. Kuni täiskasvanueani püsib teatud piirkondades vaid väike arv neuraalseid tüvirakke, mis võivad olla osaliselt relevantset kasvajate arengus. Neuroniteks arenevad need rakud ainult hippokampuses (granulaarsed rakud) ning lateraalsete ajuvatsakeste subventrikulaarses tsoonis (McKay, 1997; Temple, 2001).

Neuraalseid tüvirakke on kirjeldatud *in vivo* katsetes geneetilise märgistamisega (nt reportergeenide ekspressioon rakutüübispetsiifiliste promootorite abil), kasutades selleks *in vivo* märgistatud rakkude klonaalsete eelkäijate fenotüübilist iseloomustamist. Need katsed näitasid enamikul tüvirakkudest gliia rakkude tunnuseid, milleks olid gliia fibrillaarse happelise valgu (GFAP) ja/või aju lipiidi siduva valgu (BLBP) ekspressioon ning “radiaalse gliia” morfoloogia. Ventrikulaarses tsoonis asuv radiaalne gliia omab neurogeenset funktsionaalsust läbi terve KNS-i arengu. Arvatakse, et subventrikulaarses tsoonis olevad GFAP-positiivsed B-rakud pärinevad just radiaalsest gliiast (Merkle *et al.*, 2004; Hitoshi *et al.*, 2004).

Täiskasvanud inimese neuraalsete tüvirakkude kasulikuks omaduseks on see, et stimuleerides neid koekultuuris sobivate kasvufaktoritega, nagu näiteks epidermaalne kasvufaktor (EGF) ja fibroblasti kasvufaktor 2 (FGF2), on nad vabalt ja hulgaliselt

paljundatavad, moodustades neurosfääre. Taoline meetod võimaldab isoleerida täiskasvanu neuraalseid tüvirakke ja uurida nende funktsiooni ja arengupotentsiaali (Vescovi *et al.*, 2006). Neurosfääre vaadeldakse enamasti kui *in vitro* kultuuris kasvavaid vabalt-hõljuvaid neuraalsete tüvirakkude kobaraid. Esimesed neurosfäärid said Brent A. Reynolds ja Samuel Weiss aastal 1992, isoleerides täiskasvanud hiire ajast EGF-le reageerivad rakud. Sellegi poolest ei saa tõmmata võrdusmärki neurosfääride ja neuraalsete tüvirakkude vahele - on näidatud, et vaid väike osa (alla 1%) neurosfääri rakkudest on tõelised tüvirakud, ülejäänud aga eellasrakud (ingl k. *progenitor cells*) (Chiasson *et al.*, 1999; Seaberg *et al.*, 2003; Reynolds and Rietze, 2005). Kuna aga neuraalseid tüvirakke ei saa otseselt *in vivo* uurida, on neurosfääride *in vitro* kasvatamise meetod heaks abivahendiks paljude tüvirakkudega seotud teoreetiliste ja praktiliste küsimuste lahendamisel. Põhiliselt kasvatatakse neurosfääre söötmes, millesse on kasvustimulaatoritena lisatud epidermaalset kasvufaktorit ja fibroblasti kasvufaktorit. Neurosfääride meetodit (NSA, ingl.k. *neurosphere assay*) kasutatakse isoleerimaks oletatavaid neuraalseid tüvirakke (NSC, ingl.k. *neural stem cells*) kesknärvisüsteemist, et uurida tüvirakkude olulisemaid tunnuseid nagu proliferatsioon, enese-uuendamine ja võime anda hulgaliselt diferentseerunud ja funktsionaalseid järglasi. Samal ajal välistab eellasrakkude võime neurosfääre moodustada NSA võimalused täpselt kvantifitseerida *bona fide* tüvirakkude hulka (sagedust) lihtsalt neurosfääride arvu järgi (Deleyrolle *et al.*, 2008). Vajalik on modifitseerida kultiveerimise tingimusi, et eristada progenitor rakkude aktiivsus tüvirakkudest.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli selgitada:

- 1) kas titiin ekspresseerub hiire neuraalsetes tüvi- ja eellasrakkudes, kasutades uurimistöös vastsündinud hiire aju primaarkultuurist kasvatatud neurosfääri kultuure,
- 2) mil määral ekspresseerub titiin neurosfääridest diferentseeruvates neuronites ja gliiarakkudes,
- 3) kas neuraalsetes rakkudes seostub C-titiin F-aktiiniga
- 4) milline võiks olla neuraalsetes tüvi- ja gliiarakkudes paikneva titiini isovormi ligikaudne molekulmass

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Uurimisobjekt

Hiire (Black/ C57DI/6I) dissotsieeritud aju primaarsest rakukultuurist isoleeritud neurosfäärid.

2.2.2 Hiire neurosfääride kasvatamine ja diferentseeruma suunamine

Käesolevas töös kasutati P0 vanuseid (vastsündinud) C57DI/6I liini hiiri, kes saadi Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi sertifitseeritud Katseloomakeskusest (KL1202). P0 hiiri töödeldi vastavalt Gerard M. J. Beaudoin III *et al.* (2012) protokollile. Hiire aju preparaadid valmistati professor Aavo Valdur Mikelsaare poolt dr. Sulev Kuuse juhendamisel.

Ajukude disperseeriti rakususpensiooniks Neurobasal A (Gibco® by Life Technologies) söötmes, mis sisaldas gentamütsiini (Gibco BRL, Gaithersburg, USA). Rakususpensiooni tsentrifuugiti ja pesti ühe korra samas söötmes ning külvati kuuekannulise koekultuuri plaadile tihedusega 5000-10000 elusat rakku/ml Neurobasal A söötmes, millesse oli lisatud B27 (Gibco BRL) ja kasvufaktorid FGF2 (20 ng/ml; Peprotech), EGF (20 ng/ml; Peprotech), LIF (20 ng/ml; Chemicon) ning gentamütsiini (Gibco BRL). Tüvi/eellasrakud kasvasid neurosfääradena. Rakkudel vahetati söödet iga 3 päeva tagant ning sfääre töödeldi mehaanilise triturationsiooni meetodil iga 12-15 päeva tagant. Kasvatamine toimus 25 cm² madratsis, mida hoiti inkubaatoris 37° C juures 5% CO₂ keskkonnas.

Kui rakke suunati diferentseeruma, siis ei lisatud söötmele kasvufaktoreid, kuid lisati *all-trans* retinoidhapet (10^{-6} M) ja 1mM tsüklilist adenosiin monofosfaati (dibutüüül cAMP). Rakke kasvatati 37° C juures 5% CO₂ keskkonnas 8-kannulistes plaatides (Thermo Scientific, Nunc), millesse oli pandud polü-L-lüsiiniga (Sigma) kaetud 24 x 32mm katteklaasid. Katteklaasidele kantava polü-L-lüsiini lahuse kontsentratsioon oli 1 mg/ml. Katteklaase inkubeeriti 1 tund, eemaldati üleliigne polü-L-lüsiini lahus, ning pesti 3 korda lisandite vabas Neurobasal A söötmes. Eelnevalt madratsilt eemaldatud ja tsentrifuugitud rakud suspendeeriti, segati diferentseerumissöötmega, jaotati kannudesse ning kasvatati inkubaatoris.

2.2.3 Rakkude fikseerimine ja permeabiliseerimine

Rakkude fikseerimiseks kasutati 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahust PBS-s. Rakkudega klaasid eemaldati kasvukeskkonnast ning fikseeriti toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel pesti klaase 3 x 5 minutit PBS-ga. Üleliigse aldehüüdi eemaldamiseks asetati rakud 10 minutiks 50mM NH₄Cl PBS-i segusse. Peale kahekordset pesu PBS-ga permeabiliseeriti rakke 10 minutit 0,1%-lise Tritone X-100 lahusega PBS-s, pesti PBS-ga ning asetati säilitamiseks blokeerivasse lahusesse (0,3% kaseiin PBS-s naatriumasiidi lisandiga). Fikseeriti erinevates diferentseerumisastmetes olevaid rakke.

2.2.4 Rakkude immunotsütokeemiline värvimine

Rakke inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril primaarse antikeha lahusega, milleks oli kas hübriidoomide supernatant või puhastatud antikeha preparaat lahjendusega 1:10 blokeerimislahuses. Seejärel pesti preparaate 3 x 5 min PBS-ga ning inkubeeriti rakke 1 tund toatemperatuuril sobiva fluorokroomiga märgistatud sekundaarse antikehaga (Molecular Probes). Lõpuks pesti preparaate 3 x 5 min PBS-ga ning inkubeeriti DAPI (4',6-diamino-2-fenüülindool) lahusega (1µg/ml) toatemperatuuril 5 minutit. Peale loputamist destilleeritud vees sulundati rakud tuhmumisvastase Prolong Gold Antifade (Molecular Probes) preparaadiga. Rakkude kaksikvärvimise puhul kahe erineva primaarse antikehaga kasutati teist sekundaarset antikeha vastavalt sellele, millises organismis oli teine primaarne antikeha väljatöötatud.

2.2.5 Rakkude pildistamine

Preparaatide analüüs ja pildistamine viidi läbi kas inversioonimikroskoobiga Leica DFC310 FX ning objektiividega 10x/0.30 PH1, 20x/0.30 PH1 ja 40x/0.55 PH2 või mikroskoobiga Olympus BX, kasutades objektiive UplanFI 20x/0.50, 40x/0.75 ja 100x/1.30 Oil Iris ning Olympus DP50-CU Photographing System-i.

2.2.6 Koelõikude tegemine krüostaat-mikrotoomiga ja immunohistokeemiline värvimine

Külmutuslõikude tegemiseks kasutati hiire aju, mis kinnitati korgile, kasutades krüomatriksit. Maatriksis olev preparaat külmutati kiiresti isopentaanis, mis oli eelnevalt jahutatud vedelas lämmastikus. Külmunud preparaadist lõigati -20° C juures 7µm koelõigud, mis kanti alusklaasidele. Koe histokeemiliseks värvimiseks kasutati hematoksüliin-eosiini lahust. Koe immunohistokeemiline värvimine toimus analoogselt rakkude immunotsütokeemilise värvimisega (vt 2.2.4.). Viimase etapina viidi läbi värvitud koelõikude sulundamine ning mikroskopeerimine.

2.2.7 Uurimistöös kasutatud antikehad

2.2.7.1 Titiini-vastased antikehad

- **Tit1 5H1.1** - Käesolevas töös kasutasime titiini A-regiooni vastast hiire monoklonaalset antikeha Tit1 5H1.1, mis on saadud immuniseerimisel sünteetilise peptiidiga, mis vastab aminohapete järjestusele N-AVNKYGIGEPLESDSVVAK-C titiini A-regioonis (Mikelsaar *et al.*, 2010). Subpeptiididega läbi viidud katsetes näidati, et antikeha täpsema spetsiifilise epitoobi piirkonna võib kitsendada 6 aminohappelisele järjestusele (-AVNKYG-). See järjestus on kõrgelt konserveerunud ja esineb mitmes titiini A-regiooni Fn3 domeenis paljudel erinevatel liikidel (Mikelsaar *et al.*, 2012).
- **Tit1 PAB** – A-regiooni vastane küüliku polüklooraalne antikeha, mille puhul immunogeeniks oli sama sünteetiline peptiid, N-AVNKYGIGEPLESDSVVAK-C, mis monoklonaalse Tit1 5H1.1 puhulgi.
- **Küüliku polüklooraalne antikeha SC H-300** – (Santa Cruz Biotechnologies, Sc-28536). Epitop vastab inimese titiini C-terminuse aminohapetele vahemikus 33124-33423, kusjuures hiirel on homoloogne järjestus regioonis 33986-34285, homoloogia inimese ja hiire vahel on 93,7%.

2.2.7.2 Neuronaalsed ja gliiarakkude markerid

- astrotsüütide markerina kasutasime gliia happelise fibrillaarse valgu vastast küüliku antikeha (AbCam)
- Neuronite markerina kasutasime β-III-tubuliin vastast küüliku antikeha (AbCam, ab76287)

2.2.7.3 Neuraalsete tüvi- ja eellasrakkude markerid

- kasutasime transkriptsioonifaktori SOX2 vastast küüliku antikeha (LabAs Ltd, Tartu)
- **C-titiini ja aktiini** vahelise seose uurimisel kasutasime F-aktiiniga seostuvat fluorokroomiga märgistatud Phalloidini (Alexa Fluor® 488 Phalloidin, Invitrogen/Molecular Probes, A12379)

2.2.7.4 Sekundaarsed antikehad

- Hiire antikeha Tit1 5H1.1 puhul kasutasime sekundaarse antikehana kitses saadud hiire vastaseid polükloonseid fluorokroomiga märgistatud antikehi (Alexa Fluor® 594; Molecular Probes, Eugene, OR)
- Küülikus saadud antikehade puhul kasutasime sekundaarsete antikehadena kitses saadud küüliku vastast polükloonaalset fluorokroomiga märgistatud antikeha (Alexa Fluor® 594; A11012; Molecular Probes, Eugene, OR)

2.2.8 C-titiini molekulmassi tuvastamine SDS-PAGE elektroforeesi ja Western blotingu abil

2.2.8.1 Rakkude lüüsimine

Rakkude lüüsimisel lähtuti Peter James Cavnar *et al.*, (2008) koostatud protokollist. Rakke pesti enne lüüsimist 2 x 3 min PBS-ga. Rakud lüüsi alguses korduva külmutamise-sulatamise abil vedelas lämmastikus ja seejärel resuspendeeriti saadud segu 4° C juures puhvris (2ml glütserooli, 1.5 ml 1M DTT, 2.5ml Tris HCL 0.5M puhver pH 6.8, 0.4g SDS, 0.2mM PMSF, 10ml Milli-Q vett). Peale 15 minutit jää peal inkubeerimist tsentrifuugiti segu 15 minutit 35000 g juures, saadud supernatant eraldati ja säilitati 4° C juures.

2.2.8.2 Dot blot

Nitrotselluloos membraanile kanti 0,5 µl valguproovi. Membraani blokeeriti 30 min toatemperatuuril, kasutades selleks 0,1% PBS-Tween 20 lahust. Seejärel inkubeeriti membraani 1 tund toatemperatuuril primaarse antikeha lahuses (1:200 0,1 % PBS-Tween 20-s). Sellele järgnes membraanide pesu 5 x 5 min 0,1% PBS-Tween 20 lahuses. Peale pesu inkubeeriti membraane 1 tund toatemperatuuril sekundaarse antikeha lahuses, milleks oli kas GAM-HRP või GAR-HRP lahjendatud 0,1% PBS-Tween 20-s (1:1000). Reaktsiooni lõppedes toimus membraani pesu ning antikeha seostumine toodi nähtavaks substraadi DAB-kloronaftooli lahusega (ca 15 min). Värvusreaktsiooni peatamiseks pesti membraani Milli-Q veega.

2.2.8.3 Antigeeni tuvastamine mono- ja polükloonaalsete antikehade abil

Spetsiifilise peptiidiga (Storkbio) inhibeeriti monokloonaalset titiini antikeha Tit1 5H1.1 ja Tit1 PAB. Mõlema antikeha lahjendusele lisati 2.5 mg spetsiifilist peptiidi (hulk, mis ületab arvutuste kohaselt antikeha hulga lahuses 100x) ja jäeti üleöö 4° C juurde inkubeerima. Lahuseid inhibeeritud antikehadega kasutati kontrollina Western Blot katsetes.

2.2.8.4 Elektroforees ja western blot

Elektroforeesiks kasutati 7.5% polüakrüülamiid geel, mille valmistamisel lähtuti R.K. Scopes ja John A. Smith (2006) väljatöötatud retseptist ning protsessi läbiviimiseks kasutati Hoeferi foreesiaparaati.

Foreesi lõppedes eemaldati geel aparaadist ja tasakaalustati 15 min loksutil bloti katoodi puhvril. Samal ajal valmistati ette elektroblott, milleks niisutati alumine süsielektrood 0.3 molaarse Tris-anoodipuhvriga. Sellele asetati 4 samas puhvril niisutatud filterpaberit ja nende peale 2 filterpaberit, mis olid niisutatud 25 mM Tris-anoodipuhvril. Seejärel valmistati ette PVDF membraan, mis alustuseks niisutati metanooliga ja loksutati järgnevalt Milli-Q vees 5 minutit. Membraan asetati edasi filterpaberite pakile, selle peale paigutati katoodipuhvril tasakaalustatud geel ja kõige peale 6 katoodipuhvril niisutatud filterpaberit. Saadud pakile asetati süsielektrood ja alustati elektroblotti. Protsess toimus 72 mA juures 2 tundi.

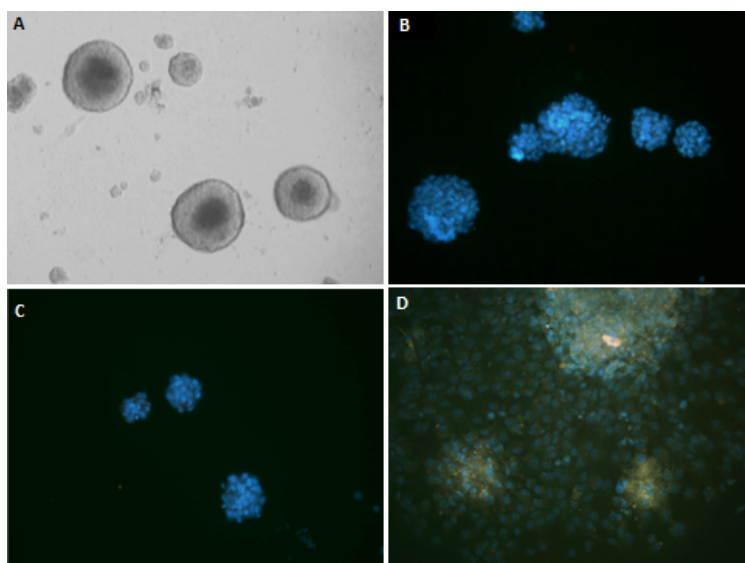
Edasi toimus blokeerimine, milleks loksutati membraani 1 tund toatemperatuuril PBS-Tween 20 0.1% lahuses. Seejärel jäeti membraan üleöö 4 kraadi juurde primaarse antikehaga (1:200 PBS-Tween 20 0.1% lahjenduses) reageerima. Reaktsiooni toimudes pesti membraan 5 x 5 min PBS-Tween 20 0.1% lahuses ja jäeti seejärel 1 tunniks peroksidaasiga konjugeeritud sekundaarse antikehaga (1:1000 PBS-Tween 20 0.1% lahjenduses) toatemperatuuril loksutile. Tunni möödudes pesti membraan 4 x 5 min PBS-Tween 20 0.1% lahuses ja 1 x 5 min PBS-s. Sellele järgnes värvusreaktsioon tekitamine substraadi DAB-kloronaftooli lahuses (10-15 min); värvusreaktsioon peatati membraani pesemisega Milli-Q veega. Järgnes membraani kuivatamine ja dokumenteerimine.

2.3 Tulemused

2.3.1 Neurosfääride kasvatamine *in vitro* ja titiini avaldumine

Neurosfääre kasvatati vastavalt eespool kirjeldatud protokollile (vt. Materjal ja metoodika).

Kolmandal päeval pärast rakkude külvi oli näha nii üksikuid rakke kui ka väikseid rakukobaraid, mis hiljem suurenesid ja omandasid „klassikalise“ neurosfääride kuju (Joonis 4, A).

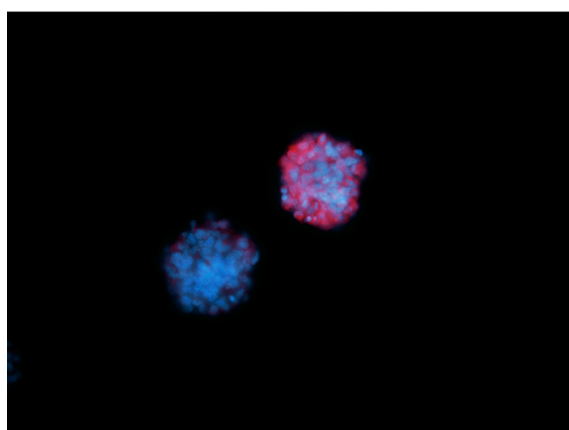


Joonis 4. P0 hiire ajust kasvatatud neurosfäärid

A. Erineva suurusega neurosfäärid koekultuuis.

B. Negatiivne kontroll (kitses saadud hiire vastane antikeha, mis on seotud Alexa Fluor[®] 488-ga). C. Negatiivne kontroll (kitses saadud küüliku vastane antikeha, mis on seotud Alexa Fluor[®] 594-ga. D. Negatiivne kontroll (peptiidiga N-AVNKYGIGEPLESDSVVAK-C inhibeeritud titiini-vastane monokloonne antikeha Tit1 5H1.1). Sekundaarne antikeha: kitses saadud hiire vastane antikeha, mis on seotud Alexa Fluor[®] 488-ga. Rakkude tuumad värviti DAPI-ga (**sinine**) (40x obj).

Joonisel 5 on näha, et neurosfääri rakud ekspresseerivad transkriptsioonifaktorit SOX2, mida peetakse neuraalsetele tüvi- ja eellasrakkude üheks spetsiifilisemaks markeriks.



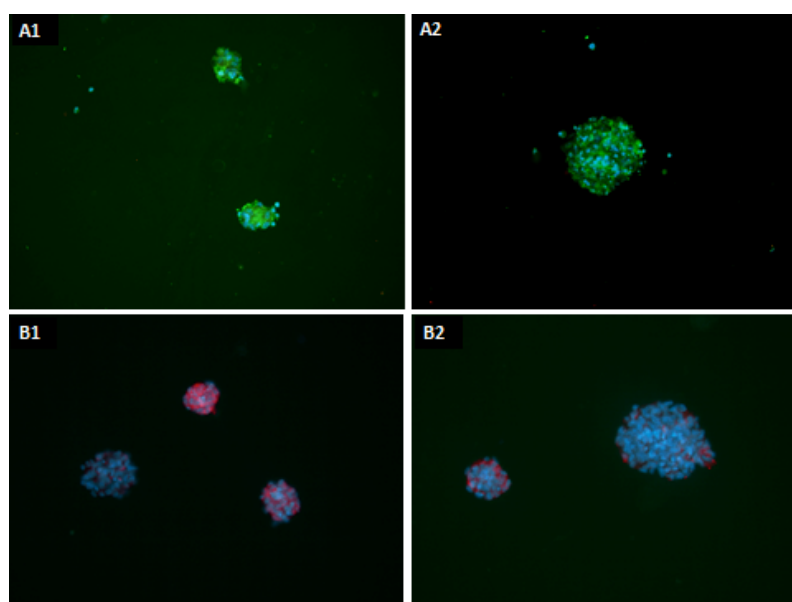
Joonis 5. Transkriptsioonifaktori SOX2 valgu tuvastamine hiire neurosfäärides

Rakud fikseeriti 4% PFA-ga ja permeabiliseeriti Triton X-100-ga. SOX2 vastane küüliku polükloonaalne antikeha. Sekundaarne antikeha: kitses saadud küüliku IgG vastane antikeha, mis on seotud Alexa Fluor[®] 594-ga (**punane**). Raku tuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (40x obj).

2.3.2 Titiini ekspressioon neurosfäärides

Titiini ekspressioon tuvastati neurosfäärides monokloonsel antikeha Tit1 5H1.1 ja komertsiaalse polükloonsel antikeha SC H-300 abil. Sekundaarsete antikehadena kasutati vastavalt kitses saadud hiire Ig vastaseid Alexa A488 märgistatud ja kitses saadud küüliku Ig vastaseid Alexa A594 märgistatud polükloonsel antikehi. Et olla kindel, et sekundaarsed antikehad rakkudega ei seostu, inkubeeriti preparaate ilma primaarse antikehata (Joonis 4 – B, C, D). Joonisel 4 on näha (D), et sünteetiline peptiid seob titiini vastase monokloonsel antikeha Tit1 5H1.1 antigeeni-spetsiifilise saidi ja immuunreaktsiooni rakkudega ei toimu.

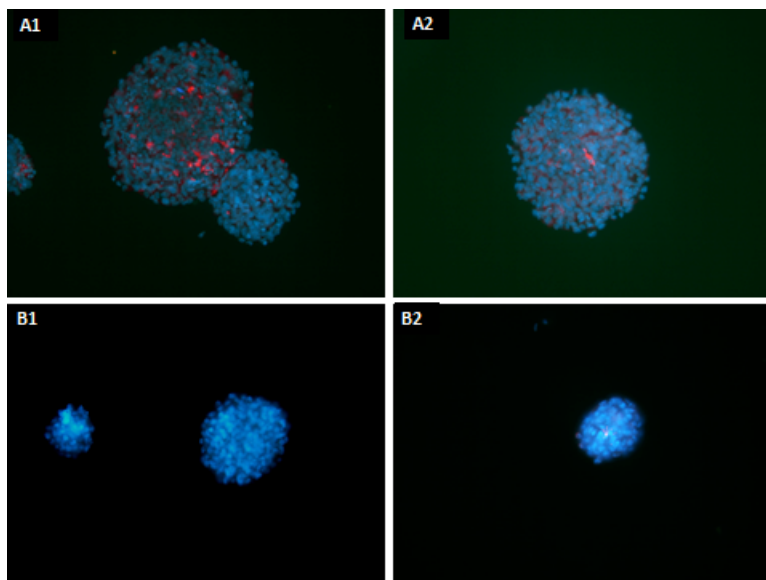
Fikseeritud ja permeabiliseeritud neurosfääride rakud värviti titiinile, kasutades titiini vastast monokloonsel antikeha Tit1 5H1.1 (Joonis 6, A1-A2) ja komertsiaalset polükloonsel titiini vastast antikeha SC H-300 (Joonis 6, B1-B2). Mõlemad antikehad näitasid titiini selget ekspressiooni uuritavatel rakkudel. Ehkki teatava variatsiooniga erinevate neurosfääride vahel.



Joonis 6. Titiini tuvastamine hiire neurosfäärides.

A1-A2. Titiini vastase monoklonaalse antikehaga Tit1 5H1.1 värvitud 4% PFA-ga fikseeritud ja permeabiliseeritud Triton X-100-ga neurosfäärid. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor[®] 488-ga konjugeeritud kitses saadud hiire IgG vastase sekundaarse antikehaga (**roheline**). **B1-B2.** Polükloonaalse antikehaga H-300 titiinile värvitud 4% PFA-ga fikseeritud ja permeabiliseeritud Triton X-100-ga neurosfäärid. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor[®] 594-ga konjugeeritud kitses saadud küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**). Raku tuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (40x obj).

Neuraalsete markerite tuvastamine näitas, et GFAP-positiivseid rakke (Joonis 7, A1-A2) on neurosfäärides vähe ning β -III-tubuliin-positiivseid (Joonis 7, B1-B2) rakke neis ei ole.



Joonis 7. Gliia fibrillaarse happelise valgu (GFAP) ja β -III-tubuliini tuvastamine hiire neurosfäärides.

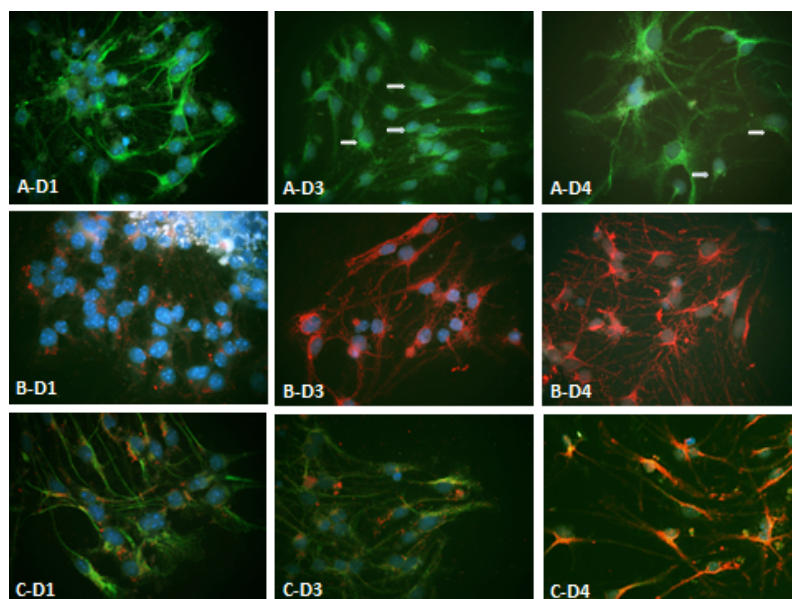
A1-A2. 4% PFA-ga fikseeritud ja permeabiliseeritud Triton X-100-ga neurosfääride värvimine GFAP-le, kasutades küülikul saadud anti-GFAP vastast polükloonaalset antikeha. Värvimine on visualiseeritud Alexa Fluor®594-ga konjugeeritud kitses saadud küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**). **B1-B2.** 4% PFA-ga fikseeritud ja permeabiliseeritud Triton X-100-ga neurosfääride värvimine β -III-tubuliinile, kasutades β -III-tubuliini vastast küüliku polükloonaalset antikeha. Värvimine on visualiseeritud Alexa Fluor®594-ga konjugeeritud kitses saadud küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**). Raku tuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (40x obj).

2.3.3 Titiini ja neuraalsete markerite (β -III-tubuliin ja GFAP) tuvastamine diferentseerunud rakkudes

Titiin oli tuvastatav neurosfääride diferentseerumise kõikides ajapunktides (Joonised 8 ja 9). Monokloonaalse antikehaga Tit1 5H1.1 (Joonis 8, A-D) visualiseeritud titiini ekspressioon oli tugev juba üks päev pärast diferentseerimise alustamist. Diferentseerumise edenedes püsis rakkudes titiini ekspressioonitase jätkuvalt kõrgena (Joonis 9, A-D). Kui 5 päeva diferentseerunud rakkude puhul esines veel üpriski tugevat rakkudevahelist võrgustikku (Joonis 9, A-D5), siis 10 päeva diferentseerunud rakkudevaheline võrgustik on oluliselt vähenenud. See-eest on eristatavad pikenenud rakujätke. Samuti on 10 päeva diferentseerunud rakkudes (Joonis 9, A- D10) näha tsentrioole, mida on ka varem tuvastatud (Mikelsaar *et al.*, 2010; 2012).

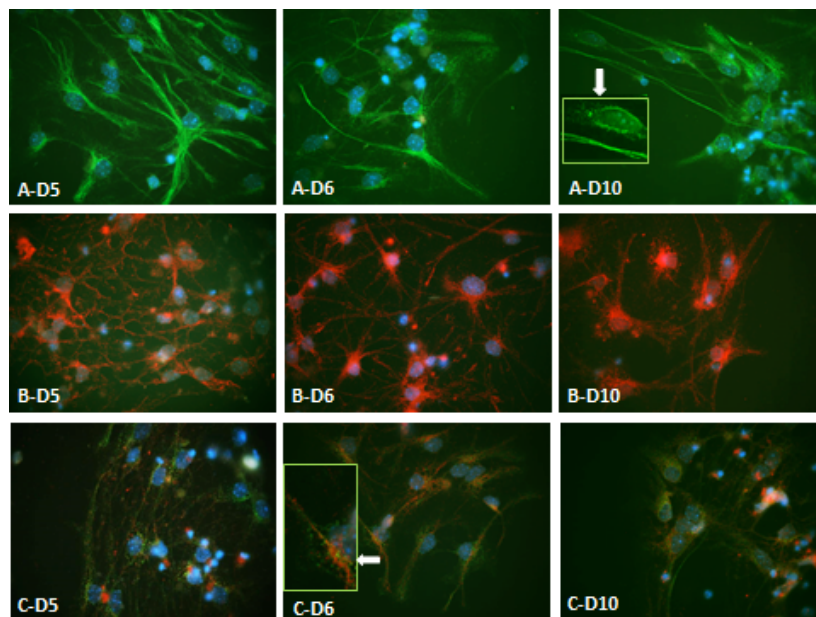
Titiini märkimisväärne ekspressioon ilmnes ka kui kasutati antikeha SC H-300 (Joonis 8 ja 9, B-D1 - B-D10). Tuleb märkida, et esimesel diferentseerumise päeval erineb monokloonsete ja polükloonaalsete antikehade reaktsioon neurosfääridel (Joonis 8, võrdle A-D1 ja B-D1). Kõrget titiini ekspressioonitaset detekteerituna polükloonsel antikehaga on näha diferentseerumiskatse lõpuni (Joonis 9, B-D). Nagu ka monokloonsel antikeha puhul on siingi näha rakkudevahelise võrgustiku kahanemist diferentseerumise edenedes. Diferentseerumise

10ndal päeval (Joonis 9, B-D10) on näha, et tekivad suuremads rakud, mis paiknevad hõredamalt.



Joonis 8. Titiini tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfääri rakkudes.

Diferentseerunud rakud hiire neurosfäärides 1. (D1), 3. (D3) ja 4. (D4) päeval. **A.** Rakud on värvitud titiinile, kasutades titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor®488-ga konjugeeritud hiire IgG vastase sekundaarse antikehaga (**roheline**). A-D3 on näha ka nooltega tähistatud värvunud tsentrioolid. **B.** Rakud on värvitud titiinile, kasutades titiini vastast polükloonset antikeha H-300. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor®594-ga konjugeeritud küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**). **C.** Rakud on kaksikvärvitud titiinile, kasutades titiini vastast hiire monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1 (alusvärving) ja küüliku polükloonset antikeha H-300. Värving on visualiseeritud vastavalt Alexa Fluor® 488 (**roheline**) ja Alexa Fluor®594 (**punane**) konjugeeritud hiire ja küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj).



Joonis 9. Titiini tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfääri rakkudes.

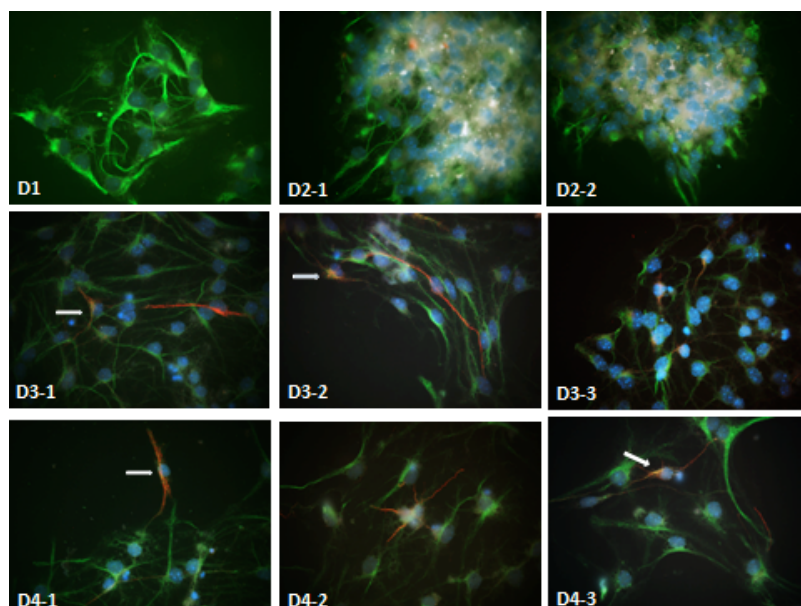
Rakud fikseeriti diferentseerumise 5. (D5), 6. (D6) ja 10. (D10) päeval. **A.** Rakud on värvitud titiini, kasutades titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor®488-ga konjugeeritud hiire IgG vastase sekundaarse antikehaga (**roheline**). **B.** Rakud on värvitud titiini, kasutades titiini vastast polükloonset antikeha H-300. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor®594-ga konjugeeritud küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**). **C.** Rakud on kaksikvärvitud titiini, kasutades titiini vastast hiire monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1 (alusvärving) ja küüliku polükloonset antikeha H-300. Värving on visualiseeritud vastavalt Alexa Fluor® 488 (**roheline**) ja Alexa Fluor®594-ga konjugeeritud hiire ja küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj).

Suurendusega väljatoodud pildidel (A-D10 ja C-D6) on näha tsentrioolide värvumine.

Kuna monokloonne antikeha Tit1 5H1.1 ja polükloonne antikeha H-300 on saadud tiini molekuli erinevate regioonide vastu, siis kasutasime kaksikvärvimist, et näha kuiõrd kattuvad on nende kahe keha värvingud (Joonised 8 ja 9, C-D1 – D10). Selgus, valdavalt seostuvad need antikehad raku eri piirkondadesse, aga on ka osalist kokkulangemist, seda eriti raku tuuma läheduses (Joonis 8, C - D4). Kuna kaksikvärvimise puhul kasutasime esimese antikehana Tit1 5H1.1, siis võib arvata, et H-300 ligipääs titiini molekulile võib olla takistatud esimese sekundaarse antikeha poolt, mis seletaks rohelse värvuse ülekaalu (Joonised 8 ja 9, C-D1 - C-D10).

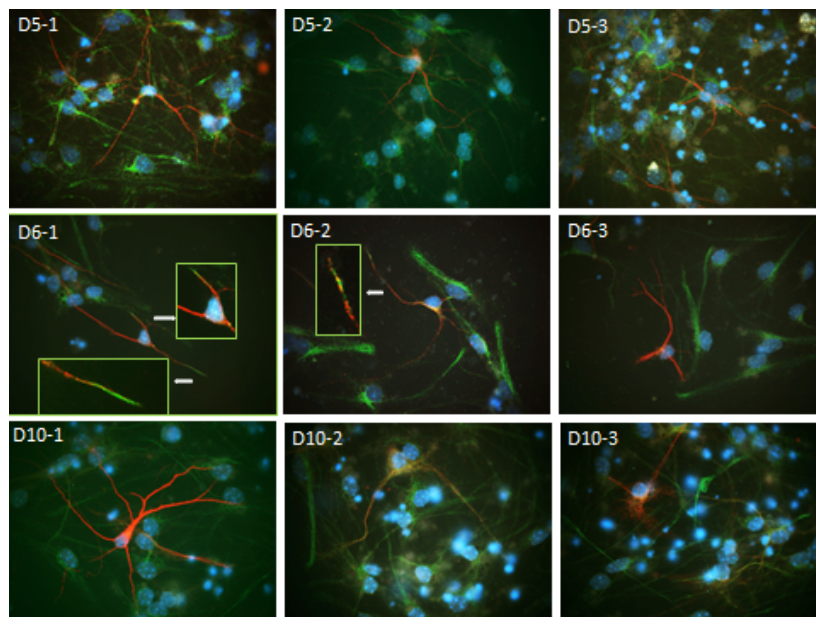
Kaksikvärvimine näitas, et neurosfääridest diferentseerunud rakkudes on tuvastatav nii titiin kui ka β -III-tubuliin (Joonis 10). Rakkudevaheline võrgustik ja sfääride kompaktsus näitavad, et diferentseerumise alguses (Joonis 10, D1-D2) on veel säilinud neurosfääride struktuur. Diferentseerumise 1. ja 2. päeval ei ole β -III-tubuliini ekspressioon tuvastatav, kuid see ilmneb alates 3. päevast. Osa rakke olid ainult β -III-tubuliin-positiivsed (ainult

punane värv), kuid harva oli märgata ka titiini ja β -III-tubuliini koospaiknemist (kollane värvus, nooleke).



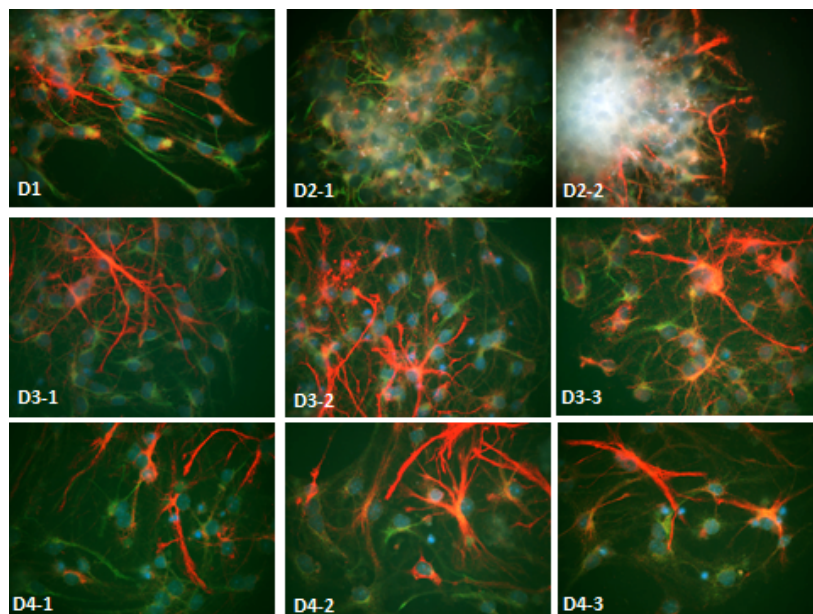
Joonis 10. Titiini ja β -III-tubuliini tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfäärade rakkudes. Rakud fikseeriti diferentseerumise 1. (D1), 2. (D2), 3. (D3) ja 4. (D4) päeval. Rakud on järjestikuliselt kaksivärvitud titiinile ja β -III-tubuliinile, kasutades esmalt titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1 ning seejärel β -III-tubuliini vastast polüklonaalset antikeha. Värvingud visualiseeriti vastavalt Alexa Fluor[®] 488 (roheline) ja A594-ga (punane) konjugeeritud hiire ja küüliku IgG vastaste sekundaarsete antikehadega. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (sinine) (100x obj). Nooled viitavad kollaselt kaksivärvunud aladele.

Diferentseerumise hilisemas perioodis (Joonis 11) ilmnes märkimisväärne erinevus diferentseerumise algfaasis olevatest rakkudest (Joonis 10). Tekkinud oli tugev rakkudevaheline võrgustik. Näha olid kaksivärvunud rakud kõrvuti puhtalt β -III-tubuliini positiivsete rakkudega (vt. D10-1). Selgesti oli mitmetes rakkudes samaaegselt tuvastatavad (vt. D6-1 ja D6-2) nii titiin-positiivsed kui ka β -III-tubuliin-positiivsed alad.



Joonis 11. Titiini ja β -III-tubuliini tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfäärade rakkudes. Rakud fikseeriti diferentseerumise 5. (D5-1, D5-2, D5-3), 6. (D6-1, D6-2, D6-3) ja 10. (D10-1, D10-2, D10-3) päeval. Rakud on järjestikuliselt kaksikvärvitud titiini ja β -III-tubuliinile, kasutades esmalt hiires saadud titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1 ning seejärel β -III-tubuliini vastast küüliku polükloonaalset antikeha. Värvingud visualiseeriti vastavalt Alexa Fluor[®]488 (**roheline**) ja A594-ga (**punane**) konjugeeritud kitses saadud hiire ja küüliku IgG vastaste sekundaarsete antikehadega. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj). Nooled (D6-1 ja D6-2) viitavad β -III-tubuliin positiivsete rakkude (neuronite) Tit1 5H1.1 positiivsetele (**punane**) osadele.

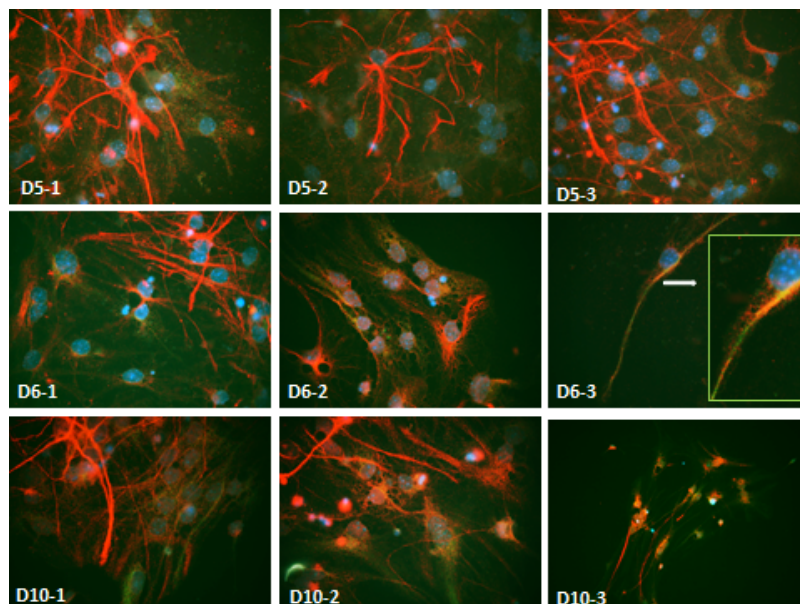
Joonisel 12 on näidatud kaksikvärvimine titiini ja gliia fibrillaarsele happelisele valgule. Juba diferentseerumise esimestel päevadel oli GFAP-positiivseid rakke kõrvuti ainult titiini ekspresseerivate rakkudega märkimisväärselt palju. Diferentseerumise kolmandaks päevaks oli näha GFAP-positiivsete rakkude hulga suurenemist ja erinevust morfoloogias, mis väljendus rakkude suurenemises ja rakujätkete pikenemises. Lisaks oli tekkinud tugev võrgustik nii Tit1 5H1.1⁺/GFAP⁺ rakkude vahel kui ka ainult GFAP-positiivsete rakkude seas. Üksikute rakkude tuumalähedastes regioonides oli näha ka kaksikvärvunud alasid. Rakupilt äärmiselt heterogeenne.



Joonis 12. Titiini ja gliia fibrillaarse happelise valgu (GFAP) tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfääri rakkudes.

Rakud fikseeriti diferentseerumise 1. (D1), 3. (D3) ja 4. (D4) päeval. Rakud on järjestikuliselt kaksikvärvitatud titiinile ja GFAP-le, kasutades esmalt hiires saadud titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1 ning seejärel GFAP-i vastast küüliku polükloonaalset antikeha. Värvingud visualiseeriti vastavalt Alexa Fluor[®]488 (**roheline**) ja A594-ga (**punane**) konjugeeritud kitses saadud hiire ja küüliku IgG vastaste sekundaarsete antikehadega. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj).

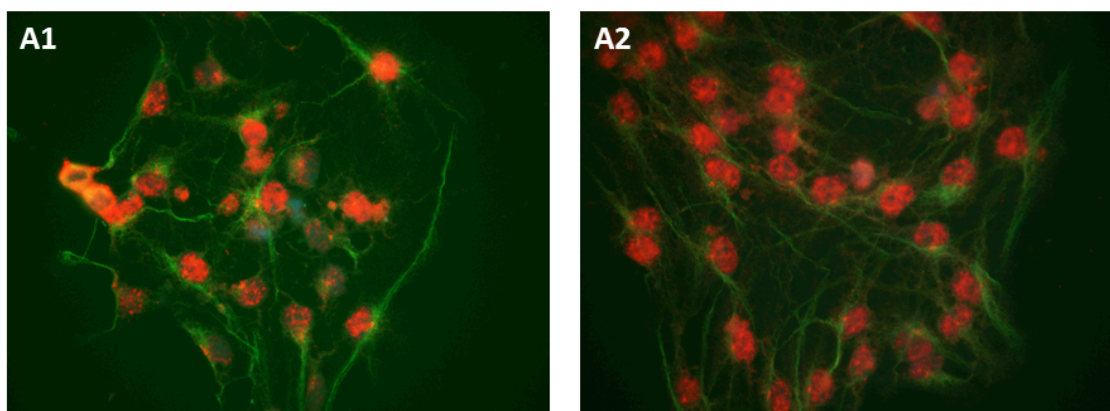
Mida rohkem rakud diferentseerusid, seda võimsamaks muutus GFAP-i ekspressioon (Joonis 13). Viis päeva diferentseerunud rakkude puhul oli GFAP-positiivsete rakkudevaheline võrgustik kasvanud veelgi, olles üsna heterogeense väljanägemisega. GFAP-i punane värvumus varjutab oluliselt, kuid mitte täiesti titiini rohelist värvi. Mõningatel juhtudel oli selgelt näha ka kaksikvärvunud alasid, mis esinesid taaskord pigem tuumaläheduses regioonis (vt. D6-3).



Joonis 13. Titiini ja gliia fibrillaarse happelise valgu (GFAP) tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfääri rakkudes.

Rakud fikseeriti diferentseerumise 5. (D5-1, D5-2, D5-3), 6. (D6-1, D6-2, D6-3) ning 10. (D10-1, D10-2, D10-3) päeval. Rakud on järjestikuliselt kaksivärvitud titiini ja GFAP-le, kasutades esmalt hiires saadud titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1 ning seejärel GFAP-i vastast küüliku polükloonaalset antikeha. Värvingud visualiseeriti vastavalt Alexa Fluor® 488 (**roheline**) ja A594-ga (**punane**) konjugeeritud kitses saadud hiire ja küüliku IgG vastaste sekundaarsete antikehadega. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj). Mõningate rakkude puhul (D6-3, nool) on selgelt eristatav titiini ja GFAP-i kaksivärving.

Kaks päeva diferentseerunud neurosfääri rakud näitasid (Joonis 14) nii transkriptsioonifaktori SOX2 kui ka titiini ekspressiooni. Värvumine SOX2-le viitab ilmselt rakkude suhteliselt madalale diferentseerumisastmele. Samas võib kahe neurosfääri rakkude vaheline SOX2-le värvumise erinevus viidata rakkude diferentseerumise erinevustele erinevates neurosfäärides (võrdle A1 ja A2, joonis 14).



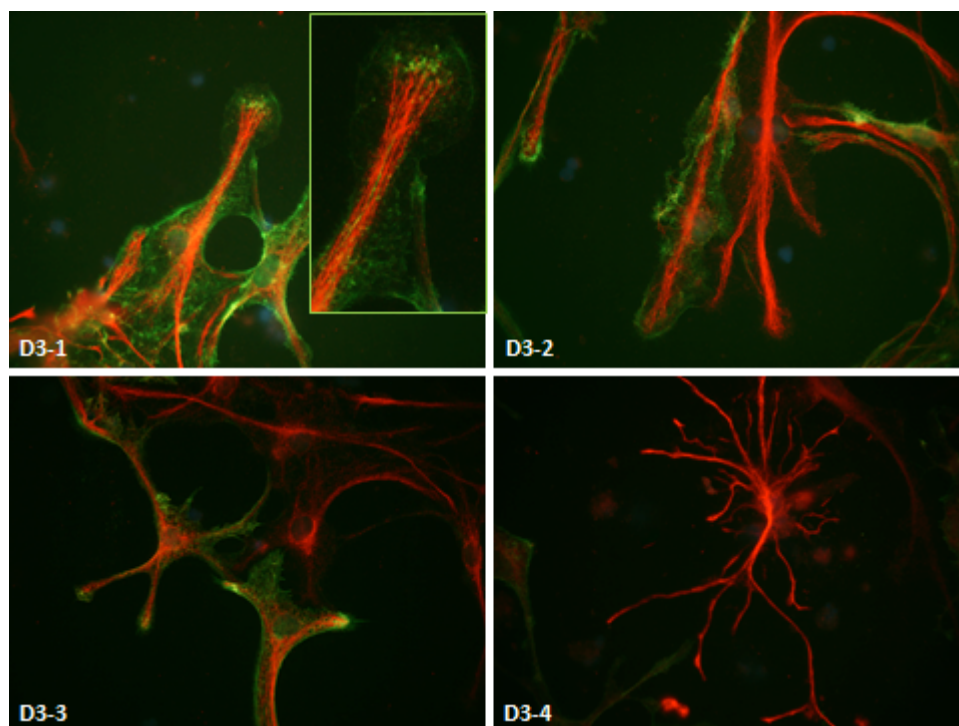
Joonis 14. Titiini ja transkriptsioonifaktori SOX2 tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfääri rakkudes.

Rakud fikseeriti diferentseerumise 2. päeval. Rakud on värvitud SOX2-le, kasutades küüliku SOX2 vastast polükloonaalset antikeha. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor® 594-ga konjugeeritud kitses saadud küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**), ja titiini, kasutades hiires saadud

titiini vastast monokloonset antikeha Tit1 5H1.1. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor®488-ga konjugeeritud kitses saadud hiire IgG vastase sekundaarse antikehaga (**roheline**). Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj).

2.3.4 Titiini ja F-aktiini ekspressioon diferentseerimisele suunatud rakkudes

Rakkude kaksikvärvimine titiinile monokloonse antikehaga Tit1 5H1.1 ja F-aktiinile Alexa Fluor®488 konjugeeritud falloidiini abil näitas, et eksisteerivad kõrvuti niihästi Titiin⁺/F-aktiin⁺ rakud kui ka Titiin⁺/F-aktiin⁻ rakud (Joonis 15). Eriliselt huvitav oli näha aktiini „punkte“ kasvukoonusesse ulatuvate titiini filamentide otstel (vt. Joonis 15, D3-1).



Joonis 15. Titiini ja F-aktiini tuvastamine hiire diferentseerunud neurosfääri rakkudes.

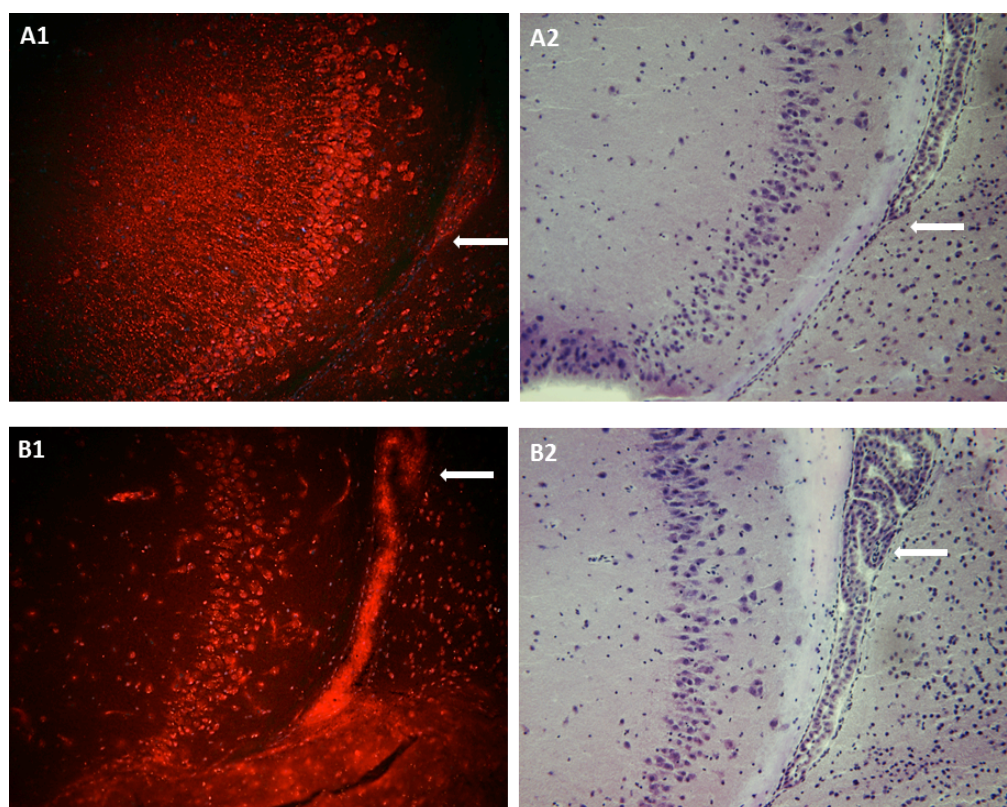
Rakud fikseeriti diferentseerumise 3. päeval ja kaksikvärviti järjestikuliselt titiinile ja F-aktiinile, kasutades esmalt titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1 ja seejärel Phalloidiini, mis on seotud Alexa Fluor®488-ga (**roheline**). Titiini spetsiifiline värving visualiseeriti Alexa Fluor®594-ga konjugeeritud kitses saadud hiire IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**). Rakkude tuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj).

Küll aga ei olnud võimalik tuvastada regulaarset c-titiini ja F-aktiini omavahelist seost, nagu seda on näidatud fibroblastide kultuuris stresskiudude juures (Cavnar, 2008). Kõrvuti kaksikvärvunud rakkudega oli võimalik näha ka F-aktiini suhtes selgelt negatiivseid rakke (vt. Joonis 15, D3-4).

2.3.5 Titiini ekspresseerumine hiire aju külmlõikudel

Neuraalsetes tüvi-ja eellasrakkudes titiini ekspressiooni tuvastamine *in vitro* tõstab küsimuse tema ekspressioonist *in vivo*. Titiini ekspressioon ajukoos pakub suurt fundamentaalset ja

praktilist huvi, kaasa arvatud tema mutatsioonide võimalik osa neuraalses patoloogias. Oleme teinud ka esimese uuringu tuvastamiseks titiini ekspressiooni hiire ajukoos, kasutades hiire aju külmlõike. Selleks värviti täiskasvanud hiire aju külmlõike titiinile, kasutades küülikul-saadud polükloonset titiini vastast antikeha Tit1 PAB1 – tulemus oli positiivne (Joonis 16). Titiiniga värvitud rakupiltidelt (Joonis 16, A1) on näha rakukihti immunovärvunud rakkude ja nende radiaalselt suunatud jätketega. Titiinile kontrollina kasutatud transkriptsioonifaktorile GATA4 (Labas Ltd, Tartu) värvitud rakkudes me rakujätkete värvumist aga ei täheldanud, küll aga oli näha talle omast rakutuumade värvumist. Et tuvastada lõigatud ala ligikaudset lokalisatsiooni ajus, värviti sama ala lõik hematoksüliin-eosiinile (A2, B2). Tulemustest võib järeldada, et tegemist on hippokampuse piirkonnaga ajus.

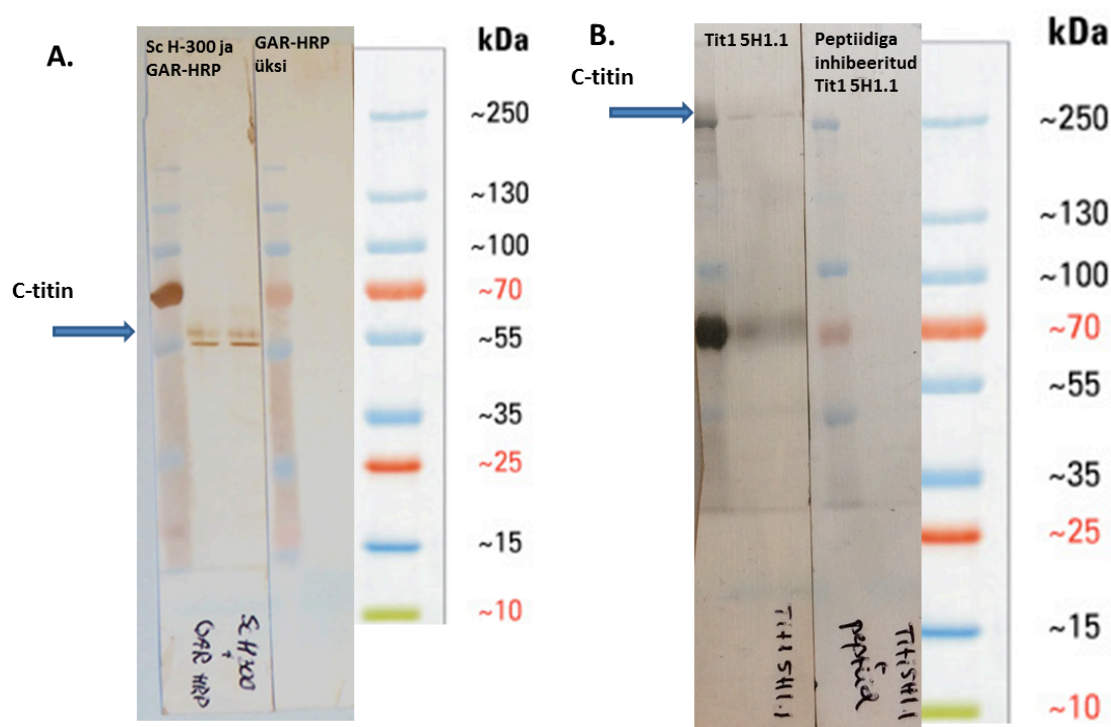


Joonis 16. Titiinile (A1) ja GATA4-le (B1) värvitud täiskasvanud hiire aju külmlõigud. Külmlõigud värviti kas titiini-vastase küülikus saadud polükloonse antikehadega Tit1 PAB1 titiinile (A1) või samuti küülikus saadud polükloonse antikehaga transkriptsioonifaktorile GATA4 (B1). Värving on visualiseeritud Alexa Fluor® 594-ga konjugeeritud kitses saadud küüliku IgG vastase sekundaarse antikehaga (**punane**). Raku tuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**). Võrdluseks värviti sama ala külmlõigud ka hematoksüliin-eosiiniga, vastavalt A2 ja B2, et tuvastada lõigatud ala ligikaudset lokalisatsiooni ajus (20x obj).

2.3.6 Titiini tuvastamine Western Blot meetodil

Teadaolevalt on lihases asuv titiin üks suurimaid valke, millel on mitmeid isovorme (Uniprot, 2015). Siit tekkis küsimus, milline võiks olla C-titiini ligikaudne molekulmass neuraalsetes tüvi- ja/või eellasrakkudes. Kommertsiaalne polükloonaalne titiini vastane antikeha SC H-300 andis reaktsiooni ~55 kDa juures (Joonis 17, A). Antikeha Tit1 5H1.1 andis reaktsiooni 250 kDa juures (titiini A-regioon) (Joonis 17, B).

Kontrollina tehtud värvimised niihästi sekundaarsete antikehadega kui ka peptiidiga inhibitsiooniga andsid negatiivsed tulemused.



Joonis 17. C-titiini molekulmassi määrmine SDS-PAGE elektroforeesi ja Western bloti abil.

A. Kommertsiaalne polükloonaalne titiini vastane antikeha SC H-300; **B.** monokloonaalne antikeha Tit1 5H1.1. Nooded viitavad titiini asukohale geelis. Valgu suuruse määramiseks kasutati markerite segu (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder).

2.4 Arutelu

Käesoleva töö esimene eesmärk oli uurida vastsündinud hiire aju primaarkultuuris kasvatatud neurosfääridel, kas titiin on tuvastatav hiire neuraalsetes tüvi- ja eellasrakkudes.

Tõepoolest, mõlema antikehaga niihästi titiini A-regiooni-vastase monokloonse antikehaga Tit1 5H1.1 kui ka kommertsiaalse titiini M-regiooni-vastase polükloonse antikehaga SC H-300 õnnestus näidata titiini ekspressiooni neuraalsetes tüvirakkudes (Joonis 6). Ka

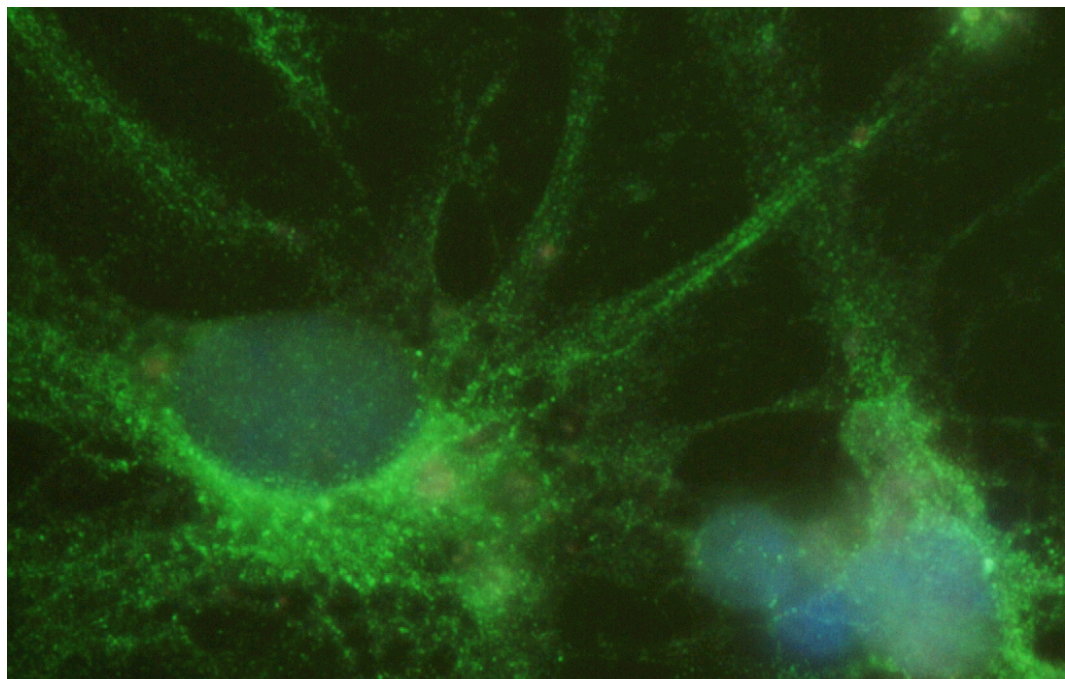
neurosfääridest 1-10 päeva diferentseerunud rakkudes oli titiini ekspressioon selge ja tugev (Joonised 8 ja 9). Kahe meie poolt kasutatud titiinivastase antikeha seostumine ei olnud valdavalt kokkulangev. Neuraalsed tüvirakud (NSC) on iseuuenevad multipotentsed rakud, millest tekivad peamised närvisüsteemi rakutüübid – neuronid, astrotsüüdid ja oligodendrotsüüdid. Neuraalsed tüvirakud on küll multipotentsed, aga siiski mitte pluripotentsed, s.t. et nad on juba teataval diferentseerumise astmel, pärinedes pluripotentsetest embrüonaalsetest tüvirakkudest. Kuna me leidsime, et titiin on tuvastatav juba neurosfääride rakkudes, siis võiks arvata, et titiini geen kas ekspresseerus diferentseerumisel embrüonaalsetest tüvirakkudest neuraalseteks tüvirakkudeks või oli ta aktiivne ka juba embrüonaalsetes tüvirakkudes. Viimase väite kasuks räägivad andmed Tit 5H1.1 epitoobi avaldumisest inimese embrüonaalsete tüvirakkude liinis hES H9.2 juba kultiveerimise teisel päeval (Mikelsaar *et al.*, 2010).

Neurosfaäre vaadeldakse enamasti kui *in vitro* kultuuris kasvavaid vabalt-hõljuvaid neuraalsete tüvirakkude kobaraid. Esimesed neurosfäärid saadi Brent A. Reynolds'i ja Samuel Weiss'i poolt aastal 1992, kui nad isoleerisid täiskasvanud hiire ajast EGF-le reageerivad rakud. Sellegi poolest ei saa tõmmata võrdusmärki neurosfääride ja neuraalsete tüvirakkude vahele - on näidatud, et vaid väike osa (alla 1%) neurosfääri rakkudest on tõelised tüvirakud, ülejäänud aga eellasrakud (Chiasson *et al.*, 1999; Seaberg *et al.*, 2003; Reynolds and Rietze, 2005).

Meie poolt kasutatud SOX2 markeri olemasolu neurosfäärides näitas nende, varajast diferentseerumise astet (Joonis 5 ja 14). Varajases embrüonaalses staadiumis on transkriptsioonifaktor SOX2 üheks neuroepiteliaalsete tüvirakkude esimeseks markeriks ja püsib multipotentsetes neuraalsetes rakkudes aktiivsena kogu täiskasvanuea (Graham *et al.*, 2003; Ferri *et al.*, 2004). *In vitro* ekspresseerivad kõik neurosfäärid SOX2, kuid varieeruva intensiivsusega. Selline NSC-de heterogeensus peegeldub ka *in vivo*. Seetõttu on väidetud, et SOX2 ekspressioon on neuraalseid tüvirakke ühendav omadus täiskasvanud hiire ajus, kuid mitte kõik NSC-d ei säilita võimet moodustada kõiki neuraalseid rakutüüpe *in vivo* (Brazel *et al.*, 2005). Sama grupp on näidanud ka SOX2 ekspressiooni kadumist diferentseeruvates neurosfäärides, väites sellega, et antud transkriptsioonifaktori ekspressioon võiks olla omane ainult multipotentsetele tüvirakkudele ja eellasrakkudele aju neurogeensetes piirkondades.

Meie poolt läbiviidud uuring nihästi titiini A-regiooni vastase antikehaga Tit1 5H1.1 kui ka titiini C-terminuse vastase antikehaga SC H-300 näitab selgesti, et C-titiin ekspresseerub nii vastsündinud hiire ajast väljakasvatatud neurosfäärides kui ka neist diferentseerunud rakkudes 10-päevase katseperioodi jooksul (Joonised 6, 8 ja 9). C-titiin on rakus nähtav

põhiliselt granulaarses vormis, kusjuures suuremad graanulid paiknevad tuuma lähedal (Joonis 18).



Joonis 18. Titiini tuvastamine hiire 4 päeva diferentseerunud neurosfääri rakkudes.

Rakud on värvitud titiini, kasutades hiires saadud titiini vastast monoklonaalset antikeha Mab Tit1 5H1.1. Värving on visualiseeritud Alexa Fluor®488-ga seotud kitses saadud hiire IgG vastase sekundaarse antikehaga (**roheline**). Rakutuumad on värvitud DAPI-ga (**sinine**) (100x obj).

Käesoleva magistritöö teiseks eesmärgiks oli tuvastada titiini olemasolu neurosfääridest diferentseeruvate neuronites ja gliiarakkudes.

GFAP-positiivsed rakud olid olemas juba neurosfäärides (Joonis 7) ja kõrvuti ainult titiini ekspresseerivate rakkudega juba diferentseerumise algul (Joonis 12). Seda, et juba neurosfäärides toimub iseeneslik diferentseerumine, on varem teada. Diferentseerumise edenedes kasvas GFAP-positiivsete rakkude hulk veelgi, lisaks võis märgata ka erinevust morfoloogias, mis väljendus rakkude ja rakujätmete pikenemises ning võrgustiku tekkes. Üksikute rakkude tuumade lähedal oli näha ka kaksikvärvunud alasid. GFAP-i ekspressioonile täiskasvanud hiire neuraalsetes tüvi- ja eellasrakkudes on viidatud varemgi (Doetsch *et al.*, 1999; Laywell *et al.*, 2000; Seri *et al.*, 2001). Garcia *et al.*, 2004 näitasid, et GFAP-i ekspresseerivad eellasrakud on valdavaks allikaks täiskasvanu neurogeneesis *in vivo*. Lisaks näitasid nad neuraalsete eellasrakkude valdavalt bipolaarset või unipolaarset morfoloogiat, samas kui mitte neurogeensed astrotsüüdid olid enamasti multipolaarsed. Need bipolaarsed ja unipolaarsed GFAP-positiivsed eellasrakud ekspresseerisid lisaks ka vimentiini ja nestiin-reguleeritud transgeene (Mignone *et al.*, 2004), mida diferentseerunud

fibrillaarse struktuuriga astrotsüüdid ei ekspresseerinud. Need uuringud väidavad, et GFAP-i ekspresseerivad neuraalsed eellasrakud ja astrotsüüdid on teineteisest küllaltki erinevad. Täiskasvanud hiire eesaju subventrikulaarse ja subgranulaarse tsooni multipotentsetes neuraalsetes eellasrakkudes leiduva GFAP-i täielik funktsioon jääb siiski ebaselgeks. Detekteeritavat efekti neurogeneesis ei ole suudetud näidata ka GFAP-i geeni deletsiooniga (Gomi *et al.*, 1995; Pekny *et al.*, 1995). Meie katses suurenes GFAP positiivsete rakkude hulk diferentseerumise käigus pidevalt, mida võiks vaadelda analoogina sellele, mis toimub *in vivo* organismi vananemisel, mil astrotsüütides kasvab GFAPi hulk järk-järgult terve eluea vältel. Huvipakkuv on probleem, kas astrotsüütideks diferentseeruvates rakkudes säilib ka titiini geeni aktiivsus. Meie tulemused viitavad sellisele võimalusele (Joonis 13, D6-3). Tit1 5H1.1/GFAP-positiivsete rakkude populatsioon on äärmiselt heterogeenne. Titiin-positiivsete rakkude ja GFAP-positiivsete rakkude vahel esines tihe võrgustik. Üksikute rakkude tuumalähedastes regioonides oli näha ka kaksikvärvunud alasid. Mida rohkem rakud diferentseerusid, seda suuremaks muutus GFAP-i ekspressioon (Joonis 13). Mõningatel juhtudel oli näha ka kaksikvärvunud alasid, mis esinesid tuumaläheduses regioonis.

Erinevalt GFAP-ist ei olnud β -III-tubuliini ekspressioon tuvastatav neurosfäärides (Joonis 6). Alles 3ndal diferentseerumise päeval muutus β -III-tubuliini ekspressioon nähtavaks (Joonis 10). Hilisemas diferentseerumisastmes (Joonis 11) ilmnis märkimisväärne muutus diferentseerumine algaasis olevatest rakkudest – tekkinud oli tugev rakkudevaheline võrgustik. Üksnes β -III-tubuliini positiivsete rakkude kõrval olid olemas ka kaksivärvunud titiin⁺/ β -III-tubuliini⁺ rakud, näidates mõlema molekuli mittekatuvat ekspressiooni. Samuti oli näha, et diferentseerumisastme suurenedes muutusid neuroneid markeeriva β -III-tubuliin – positiivsed rakud suuremaks ning selgelt eristatavamaks. Titiini ekspressiooni oli näha ka närvirakkude ja teiste rakkude sünapssides. Selgus, et β -III-tubuliini ekspresseerivad rakud tekkisid juba algselt titiin-positiivsete rakkude diferentseerumise käigus. Ka hilisemates diferentseerumise etappides oli paljudel juhtudel tuvastatav mõlema valgu koossekspressioon samades rakkudes (Joonis 10 ja 11).

Käesoleva töö kolmas eesmärk oli selgitada kas neuraalsetes rakkudes paikneb C-titiin samas piirkonnas kui F-aktiin.

Varem on näidatud c-titiini seost aktiiniga stresskiududes kui olulist titiini funktsiooni mitte-lihasrakkudes (Cavnar, 2008). Meie uuringud neurosfäärist diferentseerunud rakkudega näitasid, et kõrvuti kaksik-värvunud rakkudega oli võimalik näha ka F-aktiini suhtes negatiivseid rakke (vt. Joonis 15, D3-4). Kui mõlemad valgud olid tuvastatavad, siis paiknes

titiin tuuma lähedal enamasti koos aktiini filamentidega. Erilist huvi pakub titiini ko-lokalisatsioon F-aktiiniga aksonis ja aksoni otsas paiknevas kasvukoonuses (Joonis 15). Titiin on selgesti detekteeritav piki aksoni kuni kasvukoonuse otsani, kus ta interakteerub F-aktiini „gloobulikestega“. Aktiini ekspressioon aksonites kuni lamello- ja filopoodideni on tuntud fakt (Ven van der *et al.*, 1993; Eilertsen *et al.*, 1994; Canvar *et al.*, 2007), kuid mitte titiini selline tugev ekspressioon aksonites. Võrdluseks on esitatud kasvukoonuse struktuur (Lisas 1).

Inimese Proteoomi Atlase andmetel on leitud inimesel titiini madalatasemelist ekspressiooni suureaju kooses neuronaalsetes rakkudes, väikeaju molekulaarkihis ja Purkinje rakkudes, külgmiste vatsakeste neuronaalsetes rakkudes ning hippokampuses neuronaalsetes rakkudes. Kasutatud on kahte titiini vastast antikeha, millest üks tuvastab inimese titiini molekuli domeenide Ig-like 79 ja Ig-like 81 alas molekuli N-terminuses ja teine on monokloonne antikeha, mille epitoop ei ole teada. Immunovärvingu tulemused nende antikehadega enamasti teineteist ei kinnita.

See leid vajab kindlasti edasist uuringut, sest on näidatud, et titiini ekspressioon muutub aju sünapside seoses õppimisega (Kähnel *et al.*, 2012).

Titiini tuvastamisel nägime me ka värvunud tsentrioole (Joonis 9). C-titiini lokaliseerumist tsentrioolides on näidatud ka varasemates uuringutes (Mikelsaar *et al.*, 2010). Samuti värvus ka mitootiliste rakkude tsütoplasma ja kaksikvärvimine näitas mitoosikäävis ka β -III-tubuliini ning titiini koosesinemist. Tsentrioolid ja mitoosikäävid värvuvad eraldi. C-titiini osalemist mitoosikäävide moodustumisel on näidanud teised autorid (Werneyj *et al.*, 2001; Zastrow *et al.*, 2005; Fabian *et al.*, 2007). Lisaks on iseloomustatud titiini kui kromosomaalset valku (Maehado *et al.*, 1998; Machado *et al.*, 2000), kuid proteoomika uuringud antud väidet kinnitanud ei ole (Takata *et al.*, 2007).

Käesoleva töö neljandaks eesmärgiks oli määrata neuraalsetes tüvi- ja gliarakkudes paikneva titiini isovormi ligikaudne molekulmass.

Titiini molekulmassi määrasime SDS-PAGE elektroforeesi ja Western blot meetodil. Kuna teadaolevalt on lihases asuv titiin üks suurimaid valke, millel on mitmeid isovorme (Uniprot, 2015) ja samas on eelnevalt näidatud, et C-titiin võiks olla samas suurusjärgus, siis tekkis meil küsimus, kui suur võiks ligikaudu olla titiini isovorm (C-titiin) neuraalsetes tüvi- ja/või eellasrakkudes. Meie esialgsed tulemused näitavad, et polükloonaalne antikeha Sc H-300 tunneb ära valgu ligikaudse molekulmassiga 55 kDa ja titiini A-regioon vastane antikeha Tit1 5H1.1 valgu molekulmassiga 250 kDa. Nende tulemuste vastukäivus ei võimalda öelda,

milline on selle titiini, mis paikneb neutraalsetes tüvirakkudes, reaalne molekulmass. Ilmselt tunneb polüklooraalne antikeha Sc H-300 ära titiini ühe proteolüütilise fragmendi. Titiini tuvastamine neuraalsetes tüvi- ja eellasrakkudes *in vitro* tõstatab küsimuse tema ekspressioonist organismi ajukoes. Me uurisime ka titiini ekspressiooni hiire ajukoes, kasutades hiire aju külmlõike. Selleks värviti täiskasvanud hiire aju külmlõike titiinivastaste antikehadega, kasutades antikeha Tit1 PAB1. Katse tulemusena tuvastasime titiini ekspressiooni (Joonis 16). Tulemustest võib järeldada, et tegemist on aju hippokampuse piirkonnaga, kuid see vajab veel edasisi uuringuid.

KOKKUVÕTE

Kuna käesoleva töö eksperimentaalses osas kasutati vastsündinud hiire dissotsieeritud aju primaarsest rakukultuurist isoleeritud neurosfääre, siis sisaldab kirjanduse ülevaade kokkuvõtet neurosfääridest, neuraalsetest tüvi- ja eellasrakkudest, nende kasvatamise viisidest ja iseloomulikest tunnustest. Esitatakse ka ülevaade titiinist ning sealhulgas C-titiinist. Käsitletakse ka enimkasutatavaid neuraalseid markereid nagu β -III-tubuliin, GFAP, SOX2 ja tsütoskeleti valku F-aktiin.

Antud magistritöö üheks põhieesmärgiks oli tuvastada titiini paiknemine hiire neuraalsetes tüvi- ja eellasrakkudes ning neurosfääridest diferentseeruvates neuronites ja gliiarakkudes. Selleks uuriti titiini ekspresseerumist kasvavates neurosfäärides ja diferentseerumisele suunatud rakkudes kahe erineva titiini-vastase antikehaga. Mõlema antikehaga tuvastati titiini olemasolu niihästi neurosfäärides kui ka neist diferentseerunud rakkudes. Seda ei ole meie teada varem näidatud. GFAPi ekspressioon oli juba neurosfäärides tuvastatav, mis viitab teatavale spontaansele diferentseerumisele. β -III-tubuliini ekspressioon oli kindlaks tehtav alles 3ndal päeval pärast neurosfääride diferentseerumise algust. Põhiliste neuraalsete markerite (β -III-tubuliin ja GFAP) kaksikvärvimine koos titiiniga näitas nende koosinemist neuronites ning gliia rakkudes nii diferentseerumise varajastel kui ka hilisematel astmetel. Lisaks neuraalsetele markeritele uuriti koos ka titiini ja F-aktiini paiknemist, kuna C-titiini seost F-aktiini ja müosiiniga on peetud oluliseks stresskiudude moodustumisel. Meil siiski ei õnnestunud tuvastada hiire diferentseerunud neurosfääri rakkudes C-titiini ja F-aktiini koospaiknemist. Huvitavaks leiuks osutus titiini paiknemine rakkudes piki aksonit kuni kasvukoonuse kehani, kus ta oli kokkupuutes aktiini gloobulitega. See vajab edasist uurimist, kuna on andmeid, et titiin paikneb sünapsites ning tema hulga muutus võib olla seotud õppimisvõimega. Me püüdsime ka määrata neuraalsetes tüvi- ja gliiarakkudes oleva titiini isovormi ligikaudset molekulmassi. Selleks kasutasime SDS-PAGE elektroforeesi ja Western Blot meetodit. Selgus, et polükloonaalne antikeha Sc H-300 tunneb ära valgu suurusega 55 kDa ja monokloonaalne antikeha Tit1 5H1.1 250 kDa. Need tulemused on vastukäivad ning ei selgita, milline on neuraalsetes rakkudes paikneva titiini molekulmass, mistõttu tuleb neid katseid jätkata.

Esialgsed katsed titiini paiknemise määramiseks hiire aju külmlõikudel immunohistokeemiline värvimisega näitasid, et titiin asub hiire hippokampuse radiaalselt suunatud jätketega rakkude kihis. Edasise töö käigus on eesmärgiks määrata neuraalse titiini molekulmass, tema paiknemine ajus ja saada ettekujutus titiini ekspresseerumisest ajus seoses vananemisprotsessiga.

The expression of C-titin in mouse neural stem and progenitor cells

Karolina Noor

SUMMARY

A high molecular weight protein ~4 MDa has been discovered from the extracts of chicken intestinal epithelial brush border and human platelets. This protein binds to both alpha-actinin and nonmuscle myosin-II and was named cellular titin, C-titin, due to its similarity in structure and function to skeletal muscle titin (Eilertsen *et al.*, 1994; Eilertsen and Keller, III, 1992). There is very little data about the expression of titin in neural tissue (Max *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001). Also there is no information, which titin isoforms could exist in this tissue not to speak about possible functions.

The first aim of this study was to find out if titin is expressed in postnatal mouse brain and which types of differentiated neural cells its expression could be associated with. For this, postnatal mouse neural stem and progenitor cells were grown as neurospheres and fixed on different days after the initiation of differentiation. To detect titin in those cells different titin antibodies were used in collaboration with SOX2, β -III-tubulin and anti-GFAP rabbit polyclonal antibodies to distinguish proliferating neural stem cells, neurons and astrocytes, respectively. Titin (or c-titin in non-muscle cells) indeed was expressed in neurosphere cells and most strongly so at the early stages of differentiation. Further on, it was possible to show that in the conditions of our experiment the β -III-tubulin-positive neurons were titin-negative, but astrocytes and proliferating neural stem cells in double staining experiments showed different relationships with titin, being either titin-negative or titin-positive during differentiation, with a tendency towards a decrease of titin-positive cells and an increase of GFAP- and SOX2-positive cells. However, our preliminary results allow to predict that titin does express in cells of neural origin and might have an important role in the differentiation of certain types of neural cells. Furthermore, as titin is known to bind to both alpha-actinin and myosin-II in nonmuscle tissues, we wanted to investigate its expression with F-actin in neural tissue. For that, double staining method was used and it revealed that there is no evidence of co-expression of titin/F-actin in postnatal mouse neural stem and progenitor cells.

The second aim of this study was to investigate the molecular mass of c-titin in neural stem and progenitor cells. Results demonstrated that the molecular mass for antigen is ~55 kDa for polyclonal anti-titin antibody and a bit more than 250 kDa for monoclonal anti-titin antibody.

We also started with investigations of the expression of c-titin *in vivo*, which have revealed interesting findings. The immunohistochemical method was used on cryoslices of mouse brain. Cryoslices were immunostained with polyclonal titin antibody and revealed clearly stained cells in the section.

As C-titin expression has not been shown earlier in developing brain cells, further investigation of titin expression in *in vivo* conditions could give valuable additional information. Also an interesting problem for future studies is to analyze the association of C-titin with other proteins in non-muscle cells. Further knowledge in this field is important for better understanding of the mechanisms of brain development and the etiology of neurological diseases.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Bang, M.-L., Centner, T., Fornoff, F., Geach, A. J., Gotthardt, M., McNabb, M., Witt, C. C., Labeit, D., Gregorio, C. C., Granzier, H., Labeit, S. (2001). The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual ≈ 700 -kDa Titin Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System. *Journal of the American Heart Association*, 89, 1065-1072.

Brazel, C. Y., Limke, T. L., Osborne, J. K., Miura, T., Cai, J., Pevny, L., & Rao, M. S. (2005). Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell*, 4(4), 197–207. doi:10.1111/j.1474-9726.2005.00158.x

Canvar, P. J. (2008). Identification and Characterization of Cellular Titin. *Electronic Theses, Treatises and Dissertations*, Paper 4012.

Cavnar, P. J., Olenych, S. G., Keller, T. C. III. (2007). Molecular Identification and Localization of Cellular Titin, a Novel Titin Isoform in the Fibroblast Stress Fiber. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 64, 418-433.

Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D. (1999). Adult mammalian fore-brain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*;19: 52. 4462-71.

Christine Y. Brazel, Tobi L. Limke, Jihan K. Osborne, Takumi Miura, Jingli Cai, Larysa Pevny and Mahendra S. Rao. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* (2005). 4,, pp197–207 Doi: 10.1111/j.1474-9726.2005.00158.x

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related, genes Sox-1 and Sox-2. *Development*;122:509–20.

Deleyrolle L.P., Rietze R.L., Reynolds B.A. (2008). The neurosphere assay, a method under scrutiny. *Acta Neuropsychiatrica*,20,1,2–8; DOI: 10.1111/j.1601-5215.2007.00251.x

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716 (1999).

Eddleston, M. and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes; implications for their role in neurologic diseases. *Neurosci.* 54:15–36.

Eilertsen, K. J., Kazmierski, S. T., Keller, T. C. S. III. (1994). Cellular Titin Localization in Stress Fibers and Interaction with Myosin II Filaments in Vitro. *The Journal of Cell Biology*, 126, 1201-1210.

Eilertsen, K. J., Keller, III, T. C. (1992). Identification and Characterization of Two Huge Protein Components of the Brush Border Cytoskeleton: Evidence for a Cellular Isoform of Titin. *J. The Journal of Cell Biology*, 119, 549-557.

Eng, L. F., Lee, Y. L., Kwan, H., Brenner, M., and Messing, A. (1998). Astrocytes cultured from transgenic mice carrying the added human glial fibrillary acidic protein gene contain Rosen- thal fibers. *J. Neurosci. Res.* 53:353–360.

Fabian L, Xia X, Venkitaramani DV, Johansen KM, Johansen J, Andrew DJ, and Forer A: Titin in insect spermatocyte spindle fibers associates with microtubules, actin, myosin and the matrix proteins skeletor, megator and chromator. *J Cell Sci* 2007;120:2190-2204.

Ferri AL, Cavallaro M, Braidà D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131, 3805–3819.

Fukuda, N., Y.Wu, P.Nair, and H.L.Granzier. 2005. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J. Gen. Physiol* 125:257-271.

Garcia, a D. R., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., & Sofroniew, M. V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience*, 7(11), 1233–1241. doi:10.1038/nn1340

Gomi, H. et al. Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron* 14, 29–41 (1995).

Gotthardt, M., R.E.Hammer, N.Hubner, J.Monti, C.C.Witt, M.McNabb, J.A.Richardson, H.Granzier, S.Labeit, and J.Herz. 2003. Conditional expression of mutant M-line titins results in cardiomyopathy with altered sarcomere structure. *J. Biol. Chem.* 278:6059- 6065.

Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749–765.

Greaser, M. 2001. Identification of new repeating motifs in titin. *Proteins* 43:145-149.

Gregorio, C.C., K.Trombitas, T.Centner, B.Kolmerer, G.Stier, K.Kunke, K.Suzuki, F.Obermayr, B.Herrmann, H.Granzier, H.Sorimachi, and S.Labeit. 1998. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J. Cell Biol.* 143:1013-1027.

Hallpike, J. F., Adams, C. W. M., and Tourtellotte, W. W. (1983). Multiple Sclerosis. Pathology, diagnosis and management, Williams & Wilkins: Baltimore.

Hayashi, C., Y.Ono, N.Doi, F.Kitamura, M.Tagami, R.Mineki, T.Arai, H.Taguchi, M.Yanagida, S.Hirner, D.Labeit, S.Labeit, and H.Sorimachi. 2008. Multiple molecular interactions implicate connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*

Hitoshi, S., Seaberg, R.M., Kosciuk, C., Alexson, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Tsuji, S., van der Kooy, D., (2004). Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev.* 18, 1806–1811.

Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M., van der Kooy, D., (2002). Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* 129, 233–244.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347(6288), 44–49. doi:10.1038/347044a0

Kamachi, Y., Uchikawa, M. ja Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in Genetics* 16: 182-187.

Katsetos C.D., Legido A., Perentes E., Mork S.J. (2003). Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J. Child Neurol.* 18:851-866

Kim, K. and T.C.Keller, III. 2002. Smitin, a novel smooth muscle titin-like protein, interacts with myosin filaments in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 156:101-111.

Kähne, T., Kolodziej, A., Smalla, K.-H., Eisenschmidt, E., Haus, U.-U., Weismantel, R., ... Gundelfinger, E. D. (2012). Synaptic proteome changes in mouse brain regions upon auditory discrimination learning. *Proteomics*, 12(15-16), 2433–44. doi:10.1002/pmic.201100669

Labeit, S., & Kolmerer, B. (1995). Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5234), 293–296. doi:10.1126/science.270.5234.293

Labeit, S., Gautel, M., Lakey, A., Trinick, J. (1992). Towards a Molecular Understanding of Titin. *European Molecular Biology Organization*, 11, 1711-1716.

Labeit, S., Kolmerer, B., Linke, W. A. (1997). The Giant Protein Titin. Emerging Roles in Physiology and Patophysiology. *Circulation Research*, 80, 290-294.

Labeit, S., S.Lahmers, C.Burkart, C.Fong, M.McNabb, S.Witt, C.Witt, D.Labeit, and H.Granzier. 2006. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J. Mol. Biol.* 362:664-681.

Laura Anne Lowery & David Van Vactor. [The trip of the tip: understanding the growth cone machinery](#). *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 332-343 (May 2009) doi:10.1038/nrm2679

Laywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E.C. & Steindler, D.A. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13883–13888 (2000).

Leandro-Garcia L.J., Leskela S., Landa I., Montero-Conde C., Lopez-Jimenez E., Leton R., Cascon A., Robledo M., Rodriguez-Antona C. (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton* 67:214-223

LeWinter, M. M., & Granzier, H. L. (2013). Titin is a major human disease gene. *Circulation*, 127(8), 938–44. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.139717

Linke, W. A. (2007). Sense and Stretchability: The Role of Titin and Titin-associated Proteins in Myocardial Stress-sensing and Mechanical Dysfunction. *Cardiovascular Research*, 77, 637-648.

Linke, W.A. 2008. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 77:637- 648.

Ma, K., J.G.Forbes, G.Gutierrez-Cruz, and K.Wang. 2006. Titin as a giant scaffold for integrating stress and Src homology domain 3-mediated signaling pathways: the clustering of novel overlap ligand motifs in the elastic PEVK segment. *J. Biol. Chem.* 281:27539-27556.

Ma, K., L.Lan, and K.Wang. 2001. Polyproline II helix is a key structural motif of the elastic PEVK segment of titin. *Biochemistry* 40:3427-3438

Machado, C., Andrew, D. J. (2000). D-TITIN: a giant protein with dual roles in emmosomes and muscles. *The Journal of Cell Biology*.

Machado, C., Sunke, J. C., Andrew, D. J. (1998). Human Autoantibodies Reveal Titin as a Chromosomal Protein. *The Journal of Cell Biology*, 141, 321-333.

Maehado C, and Andrew DJ: D-TITIN: a giant protein with dual roles in emmosomes and museles. *J Cell Biol* 2000; 151:639-651.

Maehado C, SunkeJ C, and Andrew DJ: Human auto- antibodies reveal titin as a ehromosomal protein. *J Cell Biol* 1998;141:321-333.

Maruyama K, Matsubara S, Natori R, Nonomura Y, Kimura S (1977). "Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and Function". *J. Biochem.* **82** (2): 317–37. PMID 914784.

Mayans, O., van der Ven, P. F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Fürst, D. O. (1998). Structural Basis for Activation of the Titin Kinase Domain During Myofibrillogenesis. *Nature*, 395, 863–869.

McKay, R., (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66–71.

McLendon, R. E. and Bigner, D. D. (1994). Immunohistochem- istry of the glial fibrillary acidic protein: Basic and applied considerations. *Brain Pathol.* 4:221–228.

Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A.* 101, 17528–17532.

Mignone, J.L., Kukekov, V., Chiang, A.S., Steindler, D. & Enikolopov, G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 469, 311–324 (2004).

Mikelsaar, A.-V., Sünter, A., Toomik, P., Mikelsaar, R., Kalev, I., Kõiveer, A., Juronen, E. (2010). Titin A-band-specific monoclonal antibody Tit1 5H1.1. Cellular Titin as a centriolar protein in non-muscle cells. *Hybridoma* (2005), 29(5), 391–401. doi:10.1089/hyb.2009.0116

Miller, G., H.Musa, M.Gautel, and M.Peckham. 2003. A targeted deletion of the C- terminal end of titin, including the titin kinase domain, impairs myofibrillogenesis. *J. Cell Sci.* 116:4811-4819.

Miller, M. K., Bang, M.-L., Witt, C. C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A. S., Gregorio, C. C., Labeit, S. (2003). The Muscle Ankyrin Repeat Proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a Family of Titin Filament-based Stress Response Molecules. *Journal of Molecular Biology*, 333, 951-964.

Musa, H., S.Meek, M.Gautel, D.Peddie, A.J.Smith, and M.Peckham. 2006. Targeted homozygous deletion of M-band titin in cardiomyocytes prevents sarcomere formation. *J. Cell Sci.* 119:4322-4331.

Natori R (1954). "Skinned Fibres of Skeletal Muscle and the Mechanism of Muscle Contraction — A Chronological Account of the Author's Investigations into Muscle Physiology" (PDF). *Jikeikai Medical Journal* **54**.

Pekny, M. et al. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J.* 14, 1590–1598 (1995).

Pevny, L. H., & Nicolis, S. K. (2010). Sox2 roles in neural stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(3), 421–4. doi:10.1016/j.biocel.2009.08.018

Qian, X., Goderie, S.K., Shen, Q., Stern, J.H., Temple, S., (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development* 125, 3143–3152.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., Temple, S., (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69–80.

Reynolds B.A, Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*.255(5052):1707-10.

Reynolds B.A., R.L.Rietze (2005). Neural stem cells and neurospheres – re-evaluating the relationship. *Nature Methods* vol.2, no.5, 333-336; DOI:10.1038/NMETH758

Schaumburg, H. H., Powers, J. M., Raine, C. S., Suzuki, K., and Richardson, E. P. (1975). Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. *Arch Neurol.* 33:577–591.

Scopes, R., & Smith, J. A. (2006). Analysis of Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, 295–324. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-108380-9.50016-8

Seaberg RM, van der Kooy D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature de- sertation of rigorous definitions. *Trends Neurosci*;26:125-31.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. & Alvarez-Buylla, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7153–7160 (2001).

Zastrow, M. S., Flaherty, D. B., Benian, G. M., Wilson, K. L.(2005). Nuclear Titin Interacts with A- and B-type Lamins in Vitro and in Vivo. *The Journal of Cell Science*, 119, 239-249.

Zhao, S., Nichols, J., Smith, A.G. ja Li, M. (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 27: 332-342.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*;126:663–76.

Takata, H., Uchiyama, S., Nakamura, N., Nakashima, S., Kobayashi, S., Sone, T., Kimura, S., Lahmers, S., Granzier, H., Labeit, S., Matsunaga, S., Fukui, K. (2007). A Comparative Proteome Analysis of Human Metaphase Chromosomes Isolated from Two Different Celllines Reveals a Set of Conserved Chromosome-associated Proteins. *Genes to Cells*, 12, 269-284.

Tischfield M.A., Baris H.N., Wu C., Rudolph G., Van Maldergem L., He W., Chan W.M., Andrews C., Demer J.L., Robertson R.L., Mackey D.A., Ruddle J.B., Bird T.D., Gottlob I., Pieh C., Traboulsi E.I., Pomeroy S.L., Hunter D.G., Engle E.C. (2010). Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell* 140:74-87

Wang, K., McClure, J., & Tu, a. (1979). Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(8), 3698–3702. doi:10.1073/pnas.76.8.3698

Wegner M, Stolt CC. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci*;28:583–8.

Wegner, M. (1999). From head to toes: The multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Research* 27: 1409-1420.

Ven van der, P. F. M., Sehaart, G., Croes, H. J. E., Jap, P. H. K., Ginsel, L. A., Ramaekers, C. S. (1993). Titin Aggregates Associated with Intermediate Filaments Align Along Atrass Fiber-like Structures During Human Skeletal Muscle Cell Differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 106, 749-759.

Wernej, R., Ewing, C. M., Isaacs, W. B. (2001). Multiple Antibodies to Titin Immunoreact with AHNK and Localize to the Mitotic Spindle Machinery. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 50, 101-113.

Vescovi, A. L., Galli, R., & Reynolds, B. a. (2006). Brain tumour stem cells. *Nature reviews. Cancer*, 6(6), 425–36. doi:10.1038/nrc1889

Yu-Ru Liu, Zulfiqar A Laghari, Carolina A Novoa , Jaime Hughes , Jamie RM Webster , Paul E Goodwin, Sally P Wheatley¹ and Paul J Scotting. Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells. *BMC Neuroscience* 2014, 15:95

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

ExPASy Proteomics Server. <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam?Q8WZ42@1-34350> (märts, 2015)

NCBI andmebaas. [e-andmebaas] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> (märts, 2015).

NCBI andmebaas. [e-andmebaas] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9908/> (märts, 2015)

The Human Protein Atlas. [e-andmebaas] <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000155657-TTN/tissue> (mai, 2015)

Uniprot andmebaas. [e-andmebaas] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8WZ42> (märts, 2015)
Usen Life Science Inc. [http://www.uscnk.com/directory/Glial-fibrillary-acidic-protein\(GFAP\)-0068.htm](http://www.uscnk.com/directory/Glial-fibrillary-acidic-protein(GFAP)-0068.htm) (veebruuar, 2015)

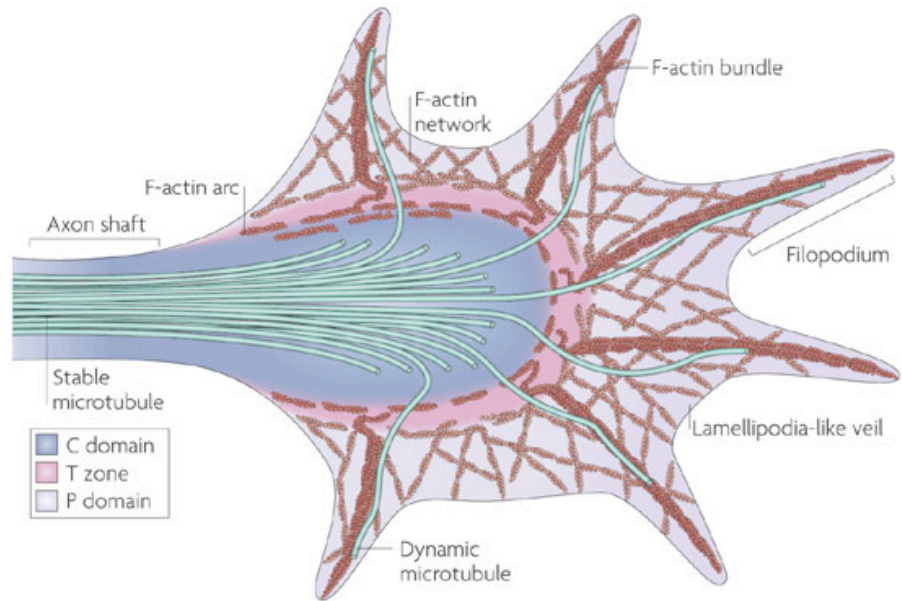
Wikipedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Titin> (märts, 2015)

TÄNUSÕNAD

Eelkõige soovin tänada Aavo Valdur Mikelsaart juhendamise, nõustamise ja motiveerimise eest kõigi nende nelja koos töötatud aasta jooksul. Samuti tänan kaasjuhendajat Sulev Ingerpuud hea nõu ja abistamise eest. Lisaks olen tänulik Anu Kõiveerile meetodite õpetamise eest ja kogu ülejäänud labori seltskonnale meeldiva ning toetava atmosfääri eest. Sulev Kuusele avaldame hiire ajukoe uurimiseks vajaliku materjali tööks ettevalmistamise juhendamise eest.

LISAD

Lisa 1. Kasvukoonuse struktuur



Nature Reviews | [Molecular Cell Biology](#)

Laura Anne Lowery and David Van Vactor (2009).

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina

_____ (autori nimi)
(sünnikuupäev: _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

—, (lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on
_____,
(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ (kuupäev)